

**RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG
VON TRIJODTHYRONIN
IM SERUM**

**METHODISCHE PROBLEME UND
KLINISCHE BEDEUTUNG ***

Klaus Reiner Blümel

***Mit Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)**

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER
MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. E.BUCHBORN

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON TRIJODTHYRONIN
IM SERUM
METHODISCHE PROBLEME UND KLINISCHE BEDEUTUNG⁺

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN
VORGELEGT VON

KLAUS REINER BLÜMEL

AUS
MÜNCHEN

1979

⁺
MIT UNTERSTÜTZUNG DER DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT
(SFB 51)

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung	17.7.1979



MEINER MUTTER

Mein Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. P.C. SCRIBA für die Überlassung des Themas, sowie für seine Hilfe, Unterstützung und wertvolle Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit, deren experimenteller Teil in den Jahren 1973/75 durchgeführt wurde.

Besonders danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. K. HORN, dessen unermüdlicher Hilfestellung ich mich jederzeit versichern konnte.

Für all ihr Bemühen sei weiter gedankt Herrn Dr. med. P.LIVESEY, Frau Priv. Doz. Dr. med. R.C. PICKARDT, Herrn D. rer. nat. Dr. med. F. ERHARDT, sowie Herrn J. HENNER bei der Lösung technischer Probleme.

INHALT

Kapitel	Liste der Abkürzungen	Seite
<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Bedeutung des Trijodthyronins im Vergleich zu Thyroxin	1
1.2.	Probleme der T_3 -Bestimmung	2
1.2.1.	Freisetzung des T_3 aus der Proteinbindung	5
1.2.2.	Chemische Ähnlichkeit des T_3 mit T_4	5
1.3.	Ziel der vorliegenden Arbeit	6
<u>2.</u>	<u>Methodik</u>	6
2.1.	Reagenzien	6
2.1.1.	Arbeitsstandards der radioaktiv markierten Substanzen	6
2.1.2.	Arbeitsstandards der unmarkierten Eichlösungen	7
2.1.3.	Verwendete Pufferlösungen	8
2.1.4.	Verwendete Gele	8
2.1.5.	TBG - blockende Substanzen	9
2.1.6.	Reagenzien zur Verhinderung der Wandadsorption von T_3	9
2.1.7.	Seren	9
2.2.	Geräte	10
2.2.1.	Apparatur zur simultanen Säulenchromatographie	10
2.2.2.	Gamma - Meßplatz	11
2.2.3.	Datenverarbeitung	11
2.3.	Methoden	12
2.3.1.	Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik	12
2.3.1.1.	Gesamthyroxin-Bestimmung	12
2.3.1.2.	T_3 - in vitro-Test	13
2.3.1.3.	Index der freien Schilddrüsenhormone	13
2.3.1.4.	Radioimmunologische TSH-Bestimmung	14
2.3.1.5.	TRH-Belastungs-Test	14
2.3.2.	Radioimmunologische Bestimmung von Prolaktin im Serum	14
2.3.3.	Radioimmunoassay für Trijodthyronin im Serum	15

2.3.3.1.	Prinzip des Radioimmunoassays	15
2.3.3.2.	Spezielle Probleme des T_3 - Radioimmunoassays	16
2.3.3.3.	T_3 - Radioimmunoassay nach chromatographischer Extraktion des T_3 aus dem Serum und Abtrennung von T_4	17
2.3.3.3.1.	Prinzip der Methode	17
2.3.3.3.2.	Praktische Durchführung	19
2.3.3.3.2.1.	Anordnung und Präparation der Chromatographiesäulen	19
2.3.3.3.2.2.	Chromatographische Extraktion von T_3	21
2.3.3.3.2.3.	Inkubation des T_3 mit dem T_3 - Antiserum	22
2.3.3.3.2.4.	Bound - Free - Trennung	22
2.3.3.3.2.5.	Auswertung der T_3 - Meßwerte	23
<u>3.</u>	<u>Ergebnisse</u>	25
3.1.	Ergebnisse zur Methode der T_3 - Bestimmung	25
3.1.1.	Wiederfinderaten von radioaktiv markiertem T_3	26
3.1.2.	Wiederfinderaten von kaltem T_3 im Serum	28
3.1.3.	Serum-Verdünnungskurven	29
3.1.4.	Kreuzreaktion von T_4 mit dem T_3 -Antiserum	32
3.1.4.1.	Herstellung eines T_3 - freien T_4 - Standards	32
3.1.4.2.	Kreuzreaktion des gereinigten T_4 mit dem T_3 -Antikörper	33
3.1.5.	Kreuzreaktion von T_4 im T_3 - Radioimmunoassay	34
3.1.6.	Vergleich mit handelsüblichen T_3 - Eichstandards	36
3.1.7.	Präzision in der Serie und von Tag zu Tag	36
3.1.8.	Untere Nachweisgrenze der Methode	36
3.2.	Klinische Ergebnisse	37
3.2.1.	T_3 - Spiegel im Serum von Normalpersonen	37
3.2.2.	Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Patienten mit Schilddrüsenunterfunktion	39

3.2.2.1.	Primäre Hypothyreose	39
3.2.2.2.	Sekundäre Hypothyreose	40
3.2.3.	Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion	43
3.2.3.1.	Klassische Hyperthyreose	44
3.2.3.2.	T_3 - Hyperthyreose	44
3.2.4.	Änderung der Schilddrüsenhormonspiegel unter antithyroidaler Behandlung der "klassischen" Hyperthyreose und der T_3 -Hyperthyreose	45
3.2.4.1.	Vergleich der Wirkungen von Methimazol und Propylthiouracil auf die T_3 - und T_4 -Spiegel	45
3.2.5.	Schilddrüsenhormonspiegel bei dekompensierten autonomen Adenomen	48
3.2.6.	Schilddrüsenhormonspiegel bei endokriner Ophthalmopathie	50
3.2.7.	Blande Struma	51
3.2.7.1.	Serumspiegel von T_3 und T_4 bei blander Struma	52
3.2.7.2.	Kaliumjodidsubstitution bei Patienten mit blander Struma	54
3.2.8.	Antwort der Schilddrüsenhormonspiegel auf einen Anstieg der TSH-Spiegel nach TRH-Gabe	55
3.2.9.	TSH-Suppression und periphere Schilddrüsenhormonspiegel nach Schilddrüsenhormonsubstitution bei hypothyreoten Patienten	57
3.2.9.1.	Serumspiegel von T_3 , T_4 und TSH bei einmaliger Gabe von T_3 , bzw. T_4	58
3.2.9.2.	Veränderungen der TSH-Spiegel, sowie der T_4 - und T_3 -Spiegel bei Patienten mit primärer Hypothyreose unter Langzeitbehandlung mit T_4 , bzw. T_3	64
3.2.9.3.	Schilddrüsenhormonspiegel nach langzeitiger T_4 - Substitution bei sekundärer Hypothyreose	68
3.2.10.	Prolaktinspiegel bei einem Patienten mit primärer Hypothyreose nach exogener Substitution mit T_3 , bzw. T_4	68

4.	<u>Methodische Vorversuche</u>	70
4.1.	T_3 - Radioimmunoassay im unextrahierten Serum bei Einsatz sog. TBG - blockender Substanzen	70
4.1.1.	Verdrängung des T_3 vom TBG	70
4.1.2.	Interferenz von TBG - blockenden Substanzen mit dem T_3 - Antikörper	71
4.1.3.	Einfluß von ANS auf die Bindung des T_3 an den T_3 - Antikörper im unextrahierten Serum	73
4.2.	Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum auf Kationenaustauschersäulen mit anschließender radioimmunologischen Bestimmung des T_3	73
4.2.1.	Weiterauftrennung der Thyronine auf Dextrangelsäulen	76
4.3.	Extraktion des T_3 aus dem Serum mit gleichzeitiger Abtrennung von T_4 auf Dextrangelsäulen	77
4.3.1.	Gel und Säulenpräparation	77
4.3.2.	pH - Wert der Extraktionssäule	78
4.3.3.	Zugabe von Natriumsalicylat	78
4.3.4.	Temperatureinfluß auf den Extraktionsschritt	80
4.4.	Radioimmunologische Bestimmung von T_3 nach Extraktion des T_3 aus dem Serum und Abtrennung des T_4	81
4.4.1.	Bound / Free - Trennung	81
4.4.2.	Beeinflussung des T_3 - Radioimmunoassays durch verschiedene Endvolumina der T_3 - Eluate	82
4.4.3.	T_3 - Antiserumkonzentration	83
4.4.4.	pH - Abhängigkeit der Antigen - Antikörper - Reaktion und Umpufferung des T_3 - Eluates	84
4.4.5.	Verhinderung der Wandadsorption	85
4.4.6.	Temperaturabhängigkeit und Inkubationszeit	85
4.5.	Optimierung des T_3 - Radioimmunoassays durch Reinigung des T_3 - Tracers im Extraktionsschritt	86

<u>5.</u>	<u>Diskussion</u>	90
5.1.	Methode	90
5.2.	Klinische Bedeutung der T_3 -Bestimmung	91
5.2.1.	Hypothyreose	91
5.2.2.	blande Struma	92
5.2.3.	Hyperthyreose	93
5.2.4.	Untersuchungen zur Rückkopplung von T_3 und T_4 auf die TSH - Sekretion	93
<u>6.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	95
<u>7.</u>	<u>Literatur</u>	97

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

T_3	Trijodthyronin
$T_3 - {}^{127} J$	L-Trijodthyronin - ${}^{127} Jod$ (stabiles Nuklid)
$T_3 - {}^{125} J$	L-Trijodthyronin - ${}^{125} Jod$ (instabiles Nuklid)
T_4	Tetraiodthyronin = Thyroxin
$T_4 - {}^{127} J$	L-THYROXIN - ${}^{127} Jod$ (stabiles Nuklid)
$T_4 - {}^{125} J$	L-THYROXIN - ${}^{125} Jod$ (instabiles Nuklid)
$PB^{127} J$	Protein Bound Iodine (proteingebundenes Jod)
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBPA	Thyroxin-bindendes Praealbumin
TBA	Thyroxin-bindendes Albumin
TSH	Thyreotropin (Thyreoidea stimulierendes Hormon)
TRH	Thyreotropin releasing hormone
HSA	Human-Albumin (human serum albumine)
BSA	Rinder-Albumin (bovine serum albumine)
IpM	Impulse pro Minute
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
ANS	8 - Anilino - 1 - Naphthalensulfonsäure

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung des Trijodthyronins im Vergleich zu Thyroxin

Nachdem im Jahre 1969 von STERLING (101,103) zum erstenmal das Krankheitsbild der " T_3 - Thyreotoxikose" beschrieben worden ist, und damit auf die eigenständige Bedeutung des Trijodthyronins (T_3) in der Pathophysiologie der Schilddrüsenfunktion aufmerksam gemacht wurde, hat das T_3 zunehmendes Interesse erlangt. Während das Thyroxin (T_4) schon im Jahre 1915 von KENDALL (59) entdeckt wurde, übersah man fast 40 Jahre das Trijodthyronin als zweites Schilddrüsenhormon, das erst im Jahre 1952 von GROSS und PITT-RIVERS (32), sowie von ROCHE und Mitarbeitern (86) entdeckt wurde. Im wesentlichen waren dafür zwei Gründe verantwortlich: Einmal verhielt sich das T_3 bei den verwendeten chromatographischen Nachweisverfahren ähnlich dem T_4 - beide Schilddrüsenhormone sind jodhaltige aromatische Aminosäuren -, zum anderen sind die T_3 -Konzentrationen im Serum so klein, daß es verfeinerter Methoden zu deren Nachweis bedurfte. Untersuchungen über die klinische Bedeutung des Trijodthyronins wurden erst in den letzten Jahren möglich, nachdem durch die Einführung des Radioimmunoassays eine vereinfachte und genauere Bestimmungsmethode zur Verfügung stand.

Bei biologisch gleichartiger Wirkung von T_3 und T_4 bestehen quantitativ erhebliche Unterschiede. So konnte schon 1953 gezeigt werden, daß das Trijodthyronin eine 4 bis 5-fach höhere Stoffwechselwirksamkeit hat als das Thyroxin (33,65) und die biologische Halbwertszeit des T_3 mit 1,4 Tagen wesentlich kürzer ist als die des T_4 mit 5,8 Tagen (Übersicht: 85). Mit Hilfe von Dialysierverfahren konnte gezeigt werden, daß mehr als 99 % aller im Blut zirkulierenden Schilddrüsenhormone an spezifische Serumträgerproteine gebunden sind und nur weniger als 1 % in freier Form im Blut vorliegen und somit dem Gewebe direkt verfügbar sind. Der in freier Form vorliegende Anteil des T_3 beträgt dabei 0,3 % und der des gesamten T_4 nur etwa 0,03 % (Übersicht 114).

Der Unterschied in der biologischen Wirksamkeit der beiden Hormone ist dabei zum Teil auf eine schwächere Bindung des T_3 gegenüber dem T_4 an diese spezifischen Trägerproteine, insbesondere an das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) zurückzuführen. Während der Bindung von T_3 und T_4 an das Thyroxin-bindende Albumin (TBA) normalerweise, verglichen mit TBG, keine wesentliche Bedeutung zukommt, hat die Bindung an das Thyroxin-bindende Praealbumin (TBPA), allerdings nur für Thyroxin, eine gewisse Bedeutung (Übersicht 114). Obwohl das Thyroxin normalerweise in 60 bis 70 fach höherer Konzentration im Serum vorliegt, unterstreichen die etwa 10 fach geringere Proteinbindung des T_3 , der 4-5 fach größere Verteilungsraum des T_3 (30 - 40 Liter gegenüber dem T_4 von 8 - 10 Litern) (44) und die relativ größeren Umsatzraten des T_3 die besondere Bedeutung dieses zweiten Schilddrüsenhormons (8,75,78). Es wurde sogar diskutiert, ob es sich bei dem Thyroxin überhaupt um ein biologisch aktives Hormon handelt, oder nicht etwa um ein Prohormon, dessen aktive Form das durch Dejodierung entstehende Trijodthyronin darstellt (17,93,98).

1.2. Probleme der T_3 -Bestimmung

Untersuchungen über die klinische Bedeutung des T_3 setzen eine einfache und exakte Bestimmungsmethode für T_3 im Serum voraus. Das Bemühen gerade um dieses Ziel spiegelt sich in einer Fülle von Methoden bzw. Modifikationen wieder, die bisher zur Messung von T_3 entwickelt und publiziert wurden, wobei auch beim Einsatz der heute praktisch ausschließlich durchgeführten radioimmunologischen Bestimmungsmethoden die zum Teil deutlich voneinander abweichenden Angaben für die T_3 -Spiegel im Serum von euthyreoten Patienten auffallen (Tab. 1). Die Schwierigkeiten der T_3 -Bestimmung liegen vor allem in der starken Proteinbindung des T_3 an die spezifisch bindenden Serumproteine und in dem geringen chemischen Unterschied von T_3 gegenüber dem T_4 .

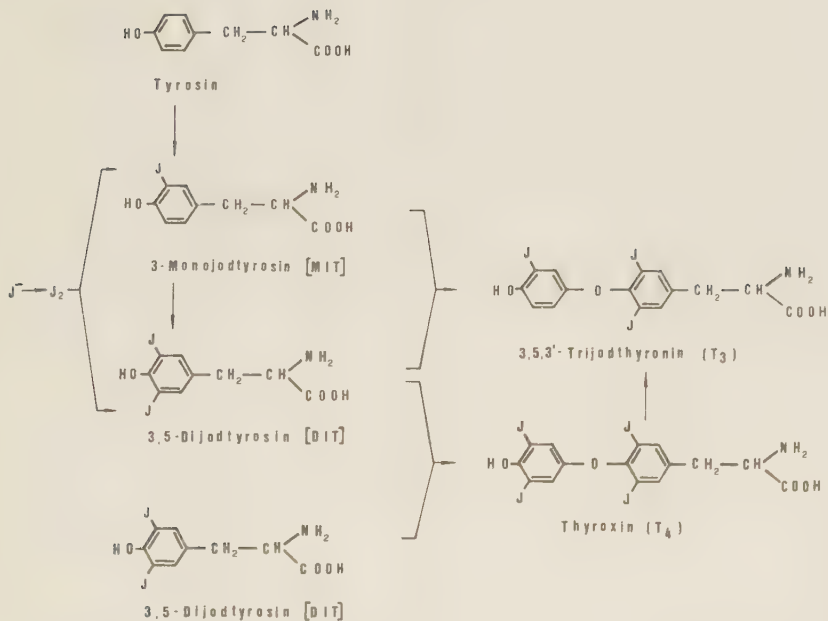


Abb. 1: Strukturformeln der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄, sowie deren Vorstufen Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT)

Autoren	Jahr	n	x±s	Bereich
Hollander C.S. (46)	1968		450	
▶ Gharib H. et al (28)	1970	100	345+83	
Naumann J.A. et al (74)	1967		330+70	
Pind K. (83)	1957		239+68	
Schreiber B.E. et al (91)	1972	18	220+50	
Sterling K. et al (102)	1969	31	220+27	
▶ Gharib H. et al (29)	1971	103	218+55	
▶ Guansing A.R. (34)	1971			70-350
Benotti J. et al (3)	1971			150-250
Schreiber B.E. et al (92)	1972	300	190	130-270
Larsen P.R. (61)	1971	17	180+40	
Burger A. (12)	1973	28	163+43	
Larsen P.R. (60)	1970	18	160+40	
▶ Surks M.I. et al (106)	1972		146+24	100-196
Horn K. et al (52)	1972	23	146+20	
▶ Liebllich J., R.D. Utiger (66)	1972	79	145+25	102-215
▶ Docter R. et al (19)	1972	67	143+32	
▶ Mitsuma T. et al (70)	1971	82	138+23	96-172
▶ A V Ruskin T.W. et al (90)	1973	83	138+10	
▶ Patel Y.C., N.G. Burger (80)	1973	257		75-177
▶ Hesck R.D. et al (41)	1972	30	135+29	
▶ Hilger P. et al (45)	1973	352	134+42	60-220
▶ Mitsuma T. et al (71)	1972		134+62	
▶ Chopra I.J. et al (14)	1971	31		100-170
▶ Trembley R., D. Bellabarba (108)	1973	100	129+41	
▶ Hesck R.D., D. Evered (42)	1973	130	120+30	80-150
▶ Hesck R.D., D. Evered (42)	1973	54	126+23	76-167
▶ Brown B.L. et al (9)	1971			75-160
Brown B.L., J. Metheany (11)	1974		160+3,5	
Rubinstein H.A. et al (87)	1973	127	119+6,3	
▶ Meinhold H., K.W. Wenzel (69)	1974	68	115+24	68-160
▶ Blümel K.R. et al (5) (55)	1974	32	113+17	79-147
▶ Chopra I.J., R.W. Lam (15,16)	1973	46	110+5,2	
▶ Burger A. et al (12)	1973	28	102+29	
Larsen P.R. (62)	1972		110+25	
Dussault J.N. et al (20)	1971	31	98+48	25-203
▶ Oddie T.H. et al (78)	1971	22 109	105+98	
▶ Werner S.C. et al (112)	1974	14	116+14	
▶ Rubinstein H.A. et al (87)	1973	57	119+6,3	
Malkus, R.K. Donabedian (67)	1974		98+35	

Tabelle 1: Auswahl der von verschiedenen Autoren mitgeteilten Mittelwerte und Bereiche des Gesamt-Trijodthyronin im Serum von Normalpersonen. Bei den mit einem ▶ versehenen Zeilen handelt es sich um radioimmunologische Bestimmungsmethoden.

1.2.1. Freisetzung des T_3 aus der Proteinbindung

Vor einem radioimmunologischen Nachweis von T_3 ist eine quantitative Freisetzung des T_3 aus der spezifischen Proteinbindung, bzw. eine vollständige Blockierung der Bindungsstellen für T_3 im Serum erforderlich (vgl. 2.3.3.2.). Die hierzu eingesetzten Verfahren einer Äthanolextraktion des T_3 aus dem Serum und anschließender Eindampfung des Alkoholextraktes beinhalten die Schwierigkeit einer standardisierten Wiederfindung des T_3 und sind darüber hinaus praktisch nicht automatisierbar (2).

Methodisch sehr aufwendig waren ebenso die Verfahren der chromatographischen Extraktion des T_3 auf Ionenaustauschern oder Dextrangelen (20,52,91,92). Heute wird in zunehmendem Maße die radioimmunologische Messung von T_3 im unextrahierten Serum unter Einsatz von sogenannten TBG-blockenden Substanzen wie Thimerosal, 8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure (ANS) und Salicylat bevorzugt. Diese Substanzen konkurrieren aufgrund einer großen Affinität zu den Trägerproteinen mit T_3 um die Bindungsstellen am aktiven Zentrum der Proteine und sind damit in der Lage, T_3 aus seiner Proteinbindung zu verdrängen. Die Richtigkeit dieser Radioimmunoassays ist allerdings umstritten. Die spezielle Problematik wird noch eingehend diskutiert (s.u. 2.3.3.2.).

1.2.2. Chemische Ähnlichkeit des T_3 mit T_4

Wie in Abbildung 1 aufgezeigt, handelt es sich bei den Schilddrüsenhormonen um jodhaltige aromatische Aminosäuren, wobei sich das Trijodthyronin vom Thyroxin nur durch das Fehlen eines Jodatoms in der 5'-Position des β -Phenolringes unterscheidet. Diese chemische Ähnlichkeit des Thyroxins mit dem Trijodthyronin bereitete vor allem bei den chemischen Nachweismethoden erhebliche Schwierigkeiten, zumal das T_4 normalerweise in etwa 60 fach höherer Konzentration im Serum anzutreffen ist als das T_3 . Bei den radioimmunologischen Nachweisverfahren von T_3 ist die Störung durch T_4 eine Frage der Spezifität des T_3 -Antiserums, d.h. der Kreuzreaktivität des T_4 mit dem T_3 -Antikörper.

1.3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen spezifischen Radioimmunoassay für die Messung von T_3 im Serum zu entwickeln, der unabhängig von den unterschiedlichen Konzentrationen der Trägerproteine, vor allem TBG und von Thyroxin mißt. Im klinischen Teil dieser Arbeit sollte dann mit Hilfe des entwickelten T_3 -Radioimmunoassays nach Krankheitsbildern mit veränderter Relation der T_3 zu T_4 -Spiegel im Serum gesucht werden, insbesondere nach T_3 -Hyperthyreosen, vor allem bei dekompensierten autonomen Adenomen und endokrinen Ophthalmopathien. Weiter sollte unter dem Aspekt der thyreoidalen Sekretion von T_3 und T_4 , sowie der peripheren Konversion von T_4 zu T_3 das Verhalten der T_3 - und T_4 -Spiegel im Serum bei TRH-induzierten TSH-Anstiegen, unter der antithyroidalen Behandlung bei Hyperthyreose, sowie unter "Monobehandlung" mit reinen T_4 -, bzw. T_3 -Präparaten bei hypothyreoten Patienten untersucht werden. Eingegangen werden sollte weiter auf die Problematik der blanden Struma und auf die Möglichkeit ihrer medikamentösen Beeinflussung.

2. METHODIK

2.1. Reagenzien

2.1.1. Arbeitsstandards der radioaktiv markierten Substanzen

Trijodthyronin - ^{125}Jod (T_3 - ^{125}J) wurde als ^{125}J -Thybon mit einer Gesamtaktivität von 25 $\mu\text{Ci/ml}$ (T_3 -Gehalt 50 ng/ml) und einer spezifischen Aktivität von ca. 500 mCi/mg T_3 von den Farbwerken Hoechst AG, Frankfurt bezogen und mit 2,5 g/l Rinderalbumin (Pentex^R, Fa. Roth, Karlsruhe) und 0,2 g/l Natriumacid (Fa. Merck, Darmstadt) in 0,05 M Barbitälpuffer auf 500 ml verdünnt (0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ = 0,1 ng T_3/ml). Dieser T_3 - ^{125}J -Arbeitsstandard wurde in Bleibehältern bei + 4°C aufbewahrt und war bis zu 2 Monaten verwendbar.

Thyroxin - ^{125}Jod (T_4 - ^{125}J) bezogen wir von der Fa. Radiochemical Center, Amersham als L-Thyroxine (^{125}I) in einer 50%igen wäßrigen Propylenglykol-Lösung. Die Gesamtaktivität betrug 20 $\mu\text{Ci/ml}$, der T_4 -Gehalt 415 ng/ml. Diese Lösung wurde mit 500 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, mit 2,5 g/l Rinderalbumin und 0,2 g/l Natriumazid auf die Gebrauchslösung weiterverdünnt (0,096 $\mu\text{Ci/ml}$ = 0,83 ng T_4/ml).

2.1.2. Arbeitsstandards der unmarkierten Eichlösungen

Trijodthyronin - ^{127}Jod (T_3 - ^{127}J) wurde von der Fa. Fluka AG, Buchs als 3,3', 5 - Trijod - L - Thyronin puriss. bezogen. Eine Menge von 1 mg wurde mit 10 ml 0,1 N Natronlauge auf eine Verdünnung von 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ gebracht und mit Aqua bidest 1:100 auf eine Konzentration von 100 ng/100 μl weiterverdünnt. Der Arbeitsstandard von 1000 pg/100 μl wurde durch eine weitere Verdünnung von 1:100 mit 0,05 M Barbitalspuffer, pH 8,6, 2,5 g/l Rinderalbumin und 0,2 g/l Natriumazid erhalten. Er wurde in kleinen Portionen abgefüllt, bei -25°C eingefroren und zur Erstellung der Eichkurven mit dem 0,05 M Barbitalspuffer, pH 8,6, zu folgenden Eichstandards verdünnt: 1000 pg, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62,5 pg, 31,25 pg, 15,6 pg, in je 100 μl .

Thyroxin- ^{127}Jod (T_4 - ^{127}J) wurde als 3,3', 5,5' Tetrajod-L-Thyroxin von der Fa. Fluka AG, Buchs bezogen und analog zum T_3 zunächst in einem kleinen Volumen 0,1 N Natronlauge gelöst und mit 2,5 g/l BSA/0,05 M Barbitalspuffer, pH 8,6 weiterverdünnt. Über Sephadex G - 25 superfine - Säulen wurde diese Lösung von T_3 - Kontaminationen und Jodidverunreinigungen gereinigt (vgl. 3.1.4.1.).

2.1.3. Verwendete Pufferlösungen

Kaliumphosphatpuffer 0,05 M, pH 11,3 - 11,5

11,4 g di - Kaliumhydrogenphosphat ($K_2HPO_4 \times 3 H_2O$) p.a. (Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 1000 ml Aqua bidest gelöst und mit 152 ml 0,1 N KOH versetzt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter kontrolliert.

Natriumbarbitalpuffer 0,05 M, pH 8,6

Veronal-Natrium wurde mit HCl auf pH 8,6 eingestellt (nach Geigy-Tabelle).

Natriumphosphatpuffer 0,05 M, pH 7,4

0,05 M Na_2HPO_4 wurde mit 0,05 M NaH_2PO_4 auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.1.4. Verwendete Gele

Sephadex G - 25 superfine (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden) wurde vor Verwendung 24 Stunden in Aqua bidest gequellt und der Überstand mit nicht sedimentierten Partikeln jeweils dreimal dekantiert.

SP-Sephadex C - 25 (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden). Dieser stark saure Kationenaustauscher wurde vor Verwendung mit 0,5 N HCl dreimal ausgeschüttelt und der Überstand jeweils verworfen.

2.1.5. TBG - blockende Substanzen

Natriumsalicylat (Fa. E. Merck, Darmstadt)

ANS 8 - Anilino - 1 - Naphthalensulfonsäure, Natriumsalz Fa. K&K Laboratories, über Fa. Serva, Heidelberg.

Thimerosal (Merthiolat) Fa. Schuchardt, München

2.1.6. Reagenzien zur Verhinderung der Wandadsorption von T₃

Hämaccel^R, Fa. Behringwerke, Marburg

Rinderalbumin (BSA), Pentex^R, Fa. Roth, Karlsruhe

2.1.7. Seren

T₃-Antiserum wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. med. R.D. Hesch, Göttingen zur Verfügung gestellt (40). Es wurde in 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 2,5 g/l BSA und 0,2 g/l Natriumazid auf eine Verdünnung von 1:100 gebracht und in Portionen von 150 µl bei -25°C eingefroren. Für den T₃-Radioimmunoassay wurde diese T₃-Antikörperlösung dann mit 0,05 M Barbitalpuffer, pH 8,6 auf eine Endverdünnung von 1:4250 weiterverdünnt.

TBG-Lösung: Das TBG-reiche Serum von Schwangeren oder Frauen unter Östrogen-Behandlung wurde zur Verwendung bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse für T₄ mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 auf eine Verdünnung von 1:60 gebracht.

"Null"-Serum: Nahezu T_4 - und T_3 -freies Serum wurde von Patienten gewonnen, die wegen einer Struma maligna einer Thyreoidektomie, Radiojodtherapie und externen Bestrahlung unterzogen worden waren und bei denen die Therapie mit T_3 (Thybon^R) 10 Tage abgesetzt war, damit zum Ausschluß von radiojodspeichernden Metastasen eine Kontrollszintigraphie durchgeführt werden konnte.

Kontrollserum: Das Serum von Normalpersonen wurde gepoolt und in kleinen Fraktionen in Eppendorf-Gefäßen bei -25°C eingefroren aufbewahrt.

Patientenserum: Nach der Blutabnahme wurde das Serum sofort abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -25°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Nachwaschserum: Restserum aus der Klinischen Chemie

2.2. Geräte

2.2.1. Apparatur zur simultanen Säulenchromatographie

Der apparative Versuchsaufbau setzte sich aus folgenden Einzelementen zusammen (vgl. Abb. 3, S. 20):

Der Thermoblock für die Säulchen zur Extraktion von T_3 aus dem Serum bestand aus einem durchsichtigen Plexiglasgehäuse, in das 25 Glassäulen (Länge: 130 mm, Lumendurchmesser: 4,6 mm) senkrecht eingepaßt waren. Die Säulen wurden über einen Umwälzthermostaten (Fa. Haake, Karlsruhe) mit 37°C -temperiertem Wasser umspült und temperaturkonstant gehalten.

Für die bei Zimmertemperatur durchgeführte Abtrennung des Antikörper-gebundenen T_3 vom freien T_3 (Bound-Free-Trennung) wurden 25 Säulen (Zylinder aus 2 ml Plastik-Einmalspritzen, die mit 2 ml Sephadex G-25 superfine gefüllt waren) in einem Aluminiumblock mit 25 senkrechten Bohrungen, angeordnet. Während der Chromatographie wurde der Durchfluß durch die Säulen mit einer 25 Kanal Proportionierpumpe (mp-Micropump, Fa. Ismatec, Zürich/Schweiz) konstant gehalten. Die Durchflußraten konnten durch die Wahl der Pumpenschläuche mit verschiedenen Innendurchmessern variiert werden. Die Proportionierschläuche waren am Eingang der Pumpe mit 25 Stahlkanülen verbunden, die in Form eines Rechens angeordnet waren. Die Probenahme erfolgte parallel aus 25 Eppendorf-Gefäßen, die in einem Plexiglasblock mit entsprechenden Bohrungen angeordnet waren. Zum Ansaugen der jeweiligen Pufferlösungen wurde der "Rechen" in die verschiedenen Pufferwannen gebracht. Als Auffangvorrichtung der von den Säulen eluierten Fraktionen dienten entsprechende Röhrchenhalter, in die Polyäthylenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml gestellt werden konnten. Die detaillierte Beschreibung der simultanen Säulenchromatographie wird im Kapitel 2.3.3.3.2. gegeben.

2.2.2. Gamma-Meßplatz: Gamma-Guard (Fa. Tracerlab., S.A. Köln). Es handelte sich um einen Szintillationszähler, der für den Nachweis der Gammastrahlung feste Natriumjodidkristalle verwendet. Das Bohrloch hat einen Innendurchmesser von 25 mm.

2.2.3. Datenverarbeitung

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit Hilfe einer EDV-Anlage Siemens 404/3.

2.3. METHODEN

2.3.1. Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik

Neben der in dieser Arbeit beschriebenen radioimmunologischen Bestimmungsmethode für T_3 kamen bei den klinischen Untersuchungen außerdem noch folgende konventionelle Schilddrüsenfunktionstests zur Anwendung:

1. Gesamtthyroxin - Bestimmung mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsanalyse (T_4 -CPBA)
2. T_3 - in vitro - Test (T_3 U)
3. Index der freien Schilddrüsenhormone (f T_4 - Index)
4. Radioimmunologische Bestimmung von TSH (TSH-RIA)
5. TRH-Belastungstest

2.3.1.1. Gesamtthyroxin-Bestimmung

Die Gesamt- T_4 -Bestimmung wurde mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsanalyse nach vorheriger Extraktion des T_4 aus dem Serum durchgeführt (53,54). Dazu wurden gleichzeitig 25 Inkubationsgemische von je 100 μ l Serum und 300 μ l T_4 -Tracer in 0,05 N Natronlauge über alkalisierte Sephadex G - 25 s.f.-Säulen chromatographiert (simultane Säulenchromatographie). Endogenes und radioaktiv markiertes T_4 wurde dabei quantitativ aus dem Serum extrahiert und an das Gel adsorbiert, die Serumproteine eluiert und verworfen. Nach Umpuffern der Säulen mit 0,05 M Natriumbarbitalpuffer, pH 8,6 wurde danach mit einer standardisierten TBG-Lösung (2.1.7.) von diesen Säulen der TBG-gebundene T_4 -Anteil eluiert und gesammelt. Der freie Anteil des T_4 wurde mit Nachwaschserum eluiert. Die Extraktion von T_4 aus dem Serum, die eigentliche kompetitive Proteinbindungsanalyse und die B/F-Trennung erfolgten dabei also nacheinander auf denselben Säulen im geschlossenen System (36,53). Der Normalbereich des Gesamt- T_4 lag zwischen 4,5 und 10 μ g/100 ml.

2.3.1.2. T_3 -in vitro-Test

Zur indirekten Bestimmung der Bindung der Schilddrüsenhormone an die Serumproteine wurde der T_3 - in vitro- Test (T_3U) eingesetzt. Das Prinzip des Testes beruht auf der Verteilung eines zum Serum zugesetzten Tracers (T_3 - ^{125}J) zwischen den Schilddrüsenhormon-bindenden Proteinen und einem um diesen Tracer konkurrierenden Adsorbens, in unserem Labor dem Dextrangel Sephadex G - 25 s.f. (51,54). Der nicht proteingebundene Anteil des radioaktiven Tracers wird als Prozentsatz der gesamten eingesetzten Tracermenge ausgedrückt. Er steht in umgekehrter prozentualer Beziehung zur Menge der Schilddrüsenhormon-bindenden Proteine im Serum. Dieser Bindungstest von in vitro-zugegebenem T_3 -Tracer ist streng von der radioimmunologischen Gesamt- T_3 -Bestimmung im Serum zu unterscheiden. Das Ergebnis des Tests wird als eine relative Größe in Prozent ausgedrückt und lag in unserem Labor für Normalpersonen in einem Bereich von 32,0 bis 42,0 %.

2.3.1.3. Index der freien Schilddrüsenhormone

Für die richtige Beurteilung der Schilddrüsenfunktionslage, vor allem bei Veränderungen der Konzentrationen an den spezifischen Transportproteinen für Schilddrüsenhormone sind nicht die Gesamthormonspiegel im Serum von Bedeutung, sondern vielmehr die absolut freien Schilddrüsenhormonspiegel. Als ein verlässlicher Parameter für dieses freie Schilddrüsenhormon hat sich der Index der freien Schilddrüsenhormone (f T_4 -Index) bewährt, der sich als Produkt von Gesamt- T_4 und T_3 - in vitro-Test berechnet (95). Der Normalbereich dieses Wertes lag in unserer Klinik zwischen 2,0 und 3,8.

2.3.1.4. Radioimmunologische TSH-Bestimmung

Die in unserem Labor durchgeführte TSH-Bestimmung erfolgte nach der Doppelantikörpermethode von ODELL und Mitarbeitern (76) in der Modifikation von ERHARDT und Mitarbeitern (22,23). Der Normalbereich der basalen TSH-Spiegel lag zwischen der unteren Nachweisgrenze der Methode (0,4 bis 1,0 $\mu\text{E/ml}$) und 3,8 $\mu\text{E/ml}$.

2.3.1.5. TRH-Belastungstest

Die Durchführung des TRH-Belastungs-Testes geschah in folgender Weise:

Nach Blutabnahme zur Bestimmung des basalen TSH-Spiegels und der peripheren Schilddrüsenhormonspiegel wurden 200 μg TRH (Fa. Hoechst AG) schnell intravenös injiziert. Nach 30 Minuten erfolgte eine zweite Blutentnahme zur Bestimmung des Anstieges des TSH-Spiegels im Serum. Dieser TRH-Belastungs-Test mit radioimmunologischer TSH-Bestimmung ist ein empfindlicher Parameter für die Beurteilung der Schilddrüsenfunktion. Bei primärer Hypothyreose sind die basalen TSH-Spiegel erhöht und steigen auf TRH-Belastung überhöht an. Umgekehrt sind die basalen TSH-Spiegel bei der Hyperthyreose supprimiert und durch TRH nicht stimulierbar. Der Normalbereich des TSH-Anstieges nach Stimulation mit 200 μg TRH lag in unserem Labor zwischen 2,7 und 23,6 $\mu\text{E/ml}$ (81).

2.3.2. Radioimmunologische Bestimmung von Prolaktin im Serum

Die Bestimmung der Prolactinspiegel im Serum erfolgte mit einer von K. v. WERDER modifizierten Doppelantikörpermethode (111), wobei die hPRL-Spiegel in $\mu\text{E/ml}$ angegeben werden.

2.3.3. Radioimmunoassay für Trijodthyronin im Serum

2.3.3.1. Prinzip des Radioimmunoassays

1960 beschrieben YALOW und BERSON zum erstenmal eine immunologische Methode zur Bestimmung von Insulin im menschlichen Serum (115). Nachdem auch von EKINS eine auf dem gleichen Prinzip beruhende Methode zur Bestimmung von Thyroxin entwickelt worden ist (21), hat man sich die Prinzipien des Radioimmunoassays zur Messung der verschiedensten Substanzen im Serum zunutze gemacht. Neben Vitaminen, Medikamenten und Virusantigenen sind es vor allem Hormone, deren geringe Konzentrationen mit einem solch empfindlichen Nachweisverfahren exakt bestimmt werden können. Der erste T_3 -Antikörper wurde im Jahre 1970 von BROWN und Mitarbeitern entwickelt (10).

Gibt man in einen Serumansatz eine wohldefinierte Menge spezifisch bindender Antikörper gegen die zu messende Substanz, so erhält man nach genügender Inkubation eine Verteilung dieser Substanz in einen Antikörper- gebundenen Teil (Bound) und in einen nicht Antikörper- gebundenen Teil (Free). Die Auftrennung von Antikörper- gebundenem und -freiem Teil geschieht vornehmlich durch Adsorptionsmittel, z.B. Aktivkohle, die den freien Teil der zu bestimmenden Substanz abfangen oder durch einen zweiten Antikörper, der den spezifischen Antikörper präzipitiert (Doppelantikörpermethode) (4). Wegen der konstanten Bindungsstellen der zugegebenen Antikörpermenge werden bei einer großen Anzahl vorhandener endogener Substanzmoleküle relativ wenige dieser Teilchen an den Antikörper gebunden vorliegen und umgekehrt bei einer geringen Substanzmenge im Ansatz relativ viele Substanzmoleküle Antikörper- gebunden sein. Einen Einblick in diese Verteilung gewinnt man, indem dem Ansatz ein Tracer zugegeben wird, der bis auf eine radioaktive Markierung vollkommen identisch mit der zu bestimmenden Substanz ist.

Die an den Antikörper gebundene, bzw. die freie Menge an radioaktiv markierter Substanz repräsentiert die Verteilung der zu bestimmenden Substanz im Ansatz. Durch Parallelansätze mit stets gleicher Menge Antikörper und stets gleicher Menge radioaktiv markierter Substanz lassen sich dann mit bekannten, definierten Standardkonzentrationen Eichkurven erstellen, an denen Proben mit unbekannten Konzentrationen abgelesen werden können.

2.3.3.2. Spezielle Probleme des T_3 -Radioimmunoassays

Die theoretischen Grundlagen des Radioimmunoassays finden bei der Messung von T_3 ihre besondere Bedeutung in einer Reihe von Voraussetzungen:

1. Es muß ein hochspezifischer Antikörper für T_3 mit einer hohen Assoziationskonstanten vorhanden sein, d.h. die Bindungsstellen am Antikörper sollten ausschließlich für T_3 vorbehalten sein.
2. Der Tracer muß sich mit dem endogenen T_3 immunoidentisch verhalten und darf sich von dem zu bestimmenden T_3 in nichts anderem unterscheiden als der radioaktiven Markierung.
3. Die Gleichgewichtsreaktion zwischen T_3 und T_3 -Antikörper darf nicht durch a) T_3 -bindende Serumproteine, insbesondere TBG,
b) andere Faktoren im Serum, wie T_4 und
c) sogenannte TBG-blockende Substanzen
gestört werden. Im einzelnen bedeutet dies, daß die starke physiologische Bindung des T_3 an die spezifischen Serumproteine (siehe 1.2.1.) irreversibel gelöst werden muß und der Einfluß des Thyroxins auf die Antigen-Antikörper-Bindung ausgeschlossen werden muß (vgl. 3.1.4.). Auf die Beeinflussung der T_3 -Messung im Serum durch die Zugabe sogenannter TBG-blockender Substanzen wird im Abschnitt 4.1. eingegangen.

4. Das Verfahren der Abtrennung der Antikörper-gebundenen von der freien T_3 -Fraktion darf die Bindung des T_3 an den T_3 -Antikörper nicht beeinflussen, d.h. die Bindungsverhältnisse dürfen sich nach Gleichgewichtseinstellung von T_3 und T_3 -Antikörper während des Auftrennungsvorganges nicht verändern.

Um diesen Voraussetzungen Rechnung zu tragen, wurde von uns eine Methode entwickelt, die es erlaubt, T_3 nach vorheriger Extraktion aus dem Serum und nach Abtrennung von T_4 radioimmunologisch zu messen.

2.3.3.3. T_3 -Radioimmunoassay nach chromatographischer Extraktion des T_3 aus dem Serum und Abtrennung von T_4

2.3.3.3.1. Prinzip der Methode

Die von uns entwickelte Methode zur radioimmunologischen Messung von T_3 im Serum beinhaltet drei Schritte (Abb. 2):

- Extraktion des T_3 aus dem Serum und Abtrennung von T_4

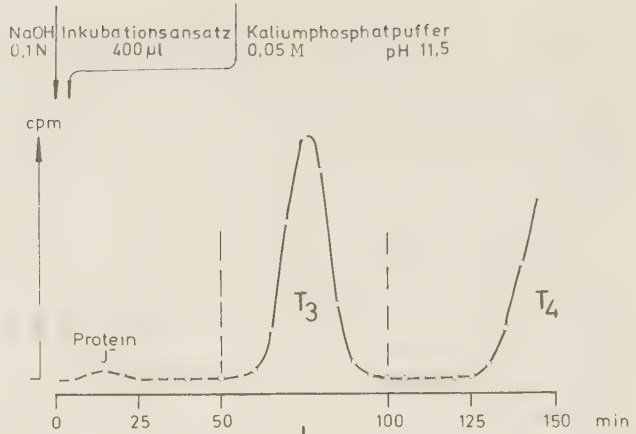
Auf alkalisierten Dextrangel-Säulen (Sephadex G - 25 superfine) werden die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 quantitativ aus der Serumproteinbindung freigesetzt. T_3 wird deutlich nach den Serumproteinen und Jodidverunreinigungen, aber deutlich vor dem T_4 -Peak eluiert.

- Inkubation des isolierten T_3 mit T_3 -Antikörper

Die von den Gelsäulen eluierte und gesammelte T_3 -Fraktion wird umgepuffert und mit dem T_3 -Antiserum inkubiert.

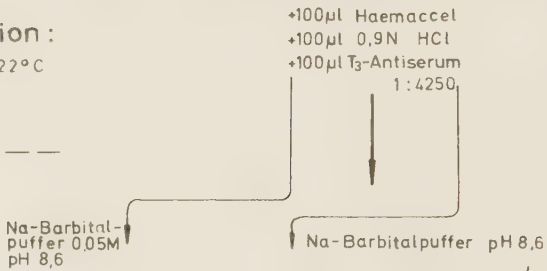
Extraktion:

Sephadex G-25
1,8 ml, T: 37°C



Inkubation:

36 Std., T: 22°C



B/F-Trennung:

Sephadex G-25
2 ml T: 22°C

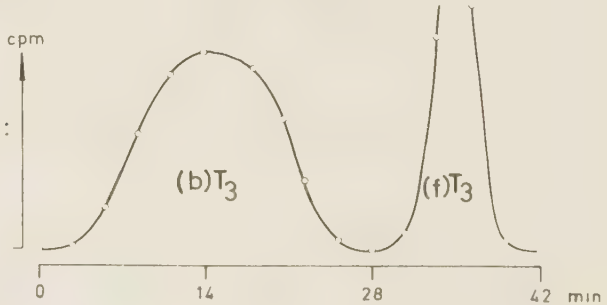


Abb. 2: Schema der radioimmunologischen Bestimmung von Trijodthyronin im Serum.

- Auftrennung von Antikörper-gebundenem und -freiem T_3

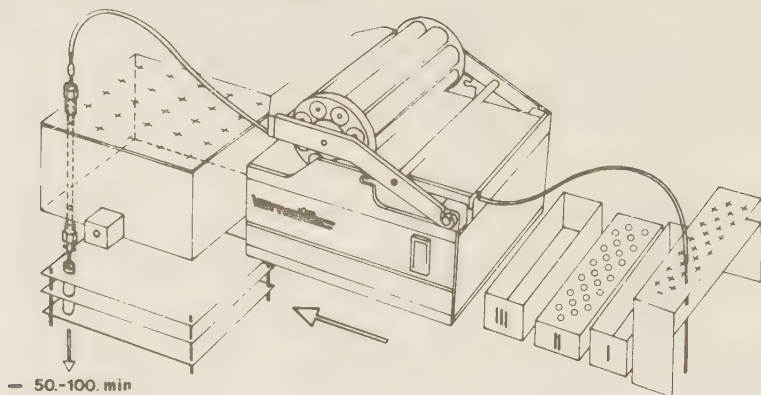
Die Auftrennung der Bound- und Free-Fraktion erfolgt ebenfalls wieder auf Dextrangelsäulen und geschieht analog zum T_3 - in vitro-Test (siehe 2.3.1.2.).

2.3.3.3.2. Praktische Durchführung

2.3.3.3.2.1. Anordnung und Präparation der Chromatographiesäulen

Der apparative Aufbau ist in der Abbildung 3 aufgezeigt. Zur chromatographischen Extraktion des T_3 aus dem Serum wurden in einem durchsichtigen Würfel aus Plexiglas 25 Glasröhrchen (130 x 8 mm, Innendurchmesser 4,6 mm) mittels Gummimuffen luft- und wasserdicht eingepaßt. Sie ragten an der Boden- und Deckplatte jeweils 1,5 cm aus dem mit Wasser gefüllten Würfel heraus. Über einen Umwälzthermostaten konnten diese zur Aufnahme des Dextrangels Sephadex G - 25 superfine bestimmten Glasröhrchen von einem gleichmäßig temperierten Wasserstrom von 37°C umspült werden. Rasch zu öffnende Zuführungs- und Auslaufvorrichtungen (Luer-Look-System) verschlossen die Säulen zu beiden Seiten. Als Auslaufspitze diente ein an Luer-Look-Gewinde anschließbares Venenkatheterstück. Das Gel wurde durch eine Glasfaserfritte vor dem Auslauf der Spritzenkanüle in dem Glasröhrchen zurückgehalten. Die Glassäulen wurden mit Hilfe einer 12 cm langen Punktionsnadel, die auf eine 20 ml Plastikspritze aufgesetzt war mit einer Suspension von Sephadex G - 25 superfine gefüllt, wobei die gleichmäßige Sedimentation des Geles und absolute Luftfreiheit der Säulen, wie auch die stets gleich hohen Flüssigkeitsspiegel über den Gelsäulen (0,5 cm) durch den Plexiglasblock hindurch kontrolliert werden konnten (Gesamt-volumen der Sephadexsäule: 1,8 ml) (Abb. 3, obere Hälfte).

I. Chromatographievorgang



— 50.-100. min
sammeln

— + 100µl Nämaccel

— umpuffern auf pH 8

— + T₃-Antiserum (Hesch) 1:4250

— 36 h inkubieren



II Bound / Free - Trennung

I : 0,1n NaOH

II : Inkubationsgemisch

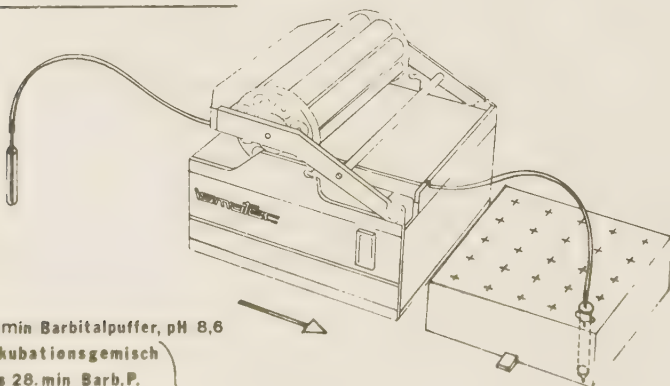
100µl T₃-Standard o. Serum

100µl T₃-125I

100µl 1% Na-Salicylat

100µl 0,04n KOH

III : 0,05m Kaliumphosphatpuffer,
pH 11,5



— 10 min Barbitarpuffer, pH 8,6

— Inkubationsgemisch

— bis 28. min Barb.P.

— 4min Poolserum

— 10min Barb.P.

wird gesammelt

2x 14min : Bound

1x 14min : Free

Abb. 3: Apparativer Aufbau zur radioimmunologischen Bestimmung von T₃ im Serum. Erklärung siehe Text.

In ähnlicher Weise geschah die Herrichtung der Gelsäulen für die Bound-Free-Trennung: Die Zylinder von 2 ml Plastik-Einmalspritzen wurden vor dem Auslauf mit einem Glasfaserplättchen abgedichtet und am Nadelansatz mit Plastikkappen verschlossen. Das Dextrangel wurde dann solange eingefüllt und der Überstand abgesaugt, bis der Spiegel des sedimentierten Geles die 2 ml-Markierung erreicht hatte. Der wäßrige Überstand wurde bis auf einen Spiegel von etwa 2 mm belassen. Zu Beginn der Chromatographie wurden dann die Plastikkappen über dem Auslauf entfernt (Abb. 3 untere Hälfte).

2.3.3.3.2.2. Chromatographische Extraktion von T_3

Aus 25 Inkubationsgefäßen (Eppendorf) wurden mit Hilfe einer stufenweise regulierbaren 25 Kanal Proportionierpumpe (Stufe 2, Pumpgeschwindigkeit 0,116 ml/min, Pumpschlauch weiß-orange) die Inkubationsansätze von 100 μ l T_3 -Standard oder un-

bekannte Serumprobe

100 μ l T_3 - 125 J-Lösung

(spez. Aktivität:

5 nCi/10 pg T_3)

100 μ l 1% Natriumsalicylat
und

100 μ l 0,04 N KOH

quantitativ auf die mit 0,1 N Natronlauge vorgespülten Sephadex G - 25 superfine-Gelsäulen im Thermoblock angesaugt, wobei peinlichst darauf geachtet wurde, daß keine Luft in die Säulen drang und der Überstand über jeder Säule mit etwa 5 mm stets konstant gehalten wurde. Nach dem Inkubationsgemisch wurde mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 11,5, weitergespült.

Das Eluat bis zur 50. Minute enthielt alle Serumproteine und Tracerverunreinigungen, vor allem Jodid, und wurde verworfen oder zur Überprüfung der quantitativen Extraktion am Gammameßplatz gezählt. Der T_3 -Peak wurde von der 50. bis zur 100. Minute in jeweils einer Fraktion in einem Gesamtvolumen von ca. 6 ml in 10 ml Polyäthylenröhrchen gesammelt. Auf die Elution des T_4 -Peaks wurde verzichtet, da dies einen Zeitaufwand von mehr als 2 Stunden bedeutet hätte (Abb. 2). Für jeden Durchgang wurden neue, auf die oben beschriebene Art präparierte Gelsäulen verwendet.

2.3.3.3.2.3. Inkubation des T_3 mit dem T_3 -Antiserum

Zur Verhinderung einer Wandadsorption des im Eluates enthaltenen T_3 wurden dem Eluat 100 μ l Haemaccel^R zugegeben (vgl. 4.4.5.). Danach erfolgte die Neutralisation des alkalischen Eluates mit 100 μ l 0,09 N HCl. Vorversuche hatten gezeigt, daß der pH-Wert daraufhin um 7,5 - 8,4 schwankte (vgl. 4.4.4.). Im Anschluß daran wurden in jedes Eluat jeweils 100 μ l T_3 - Antiserum in einer Verdünnung von 1 : 4250 zugegeben. Die Endverdünnung des T_3 - Antiserums betrug damit 1 : 250000. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von etwa 36 Stunden (vgl. 4.4.6.), wobei das Inkubationsgemisch von ca. 6 ml auf einem sich langsam drehenden Rotor kontinuierlich durchmischt wurde.

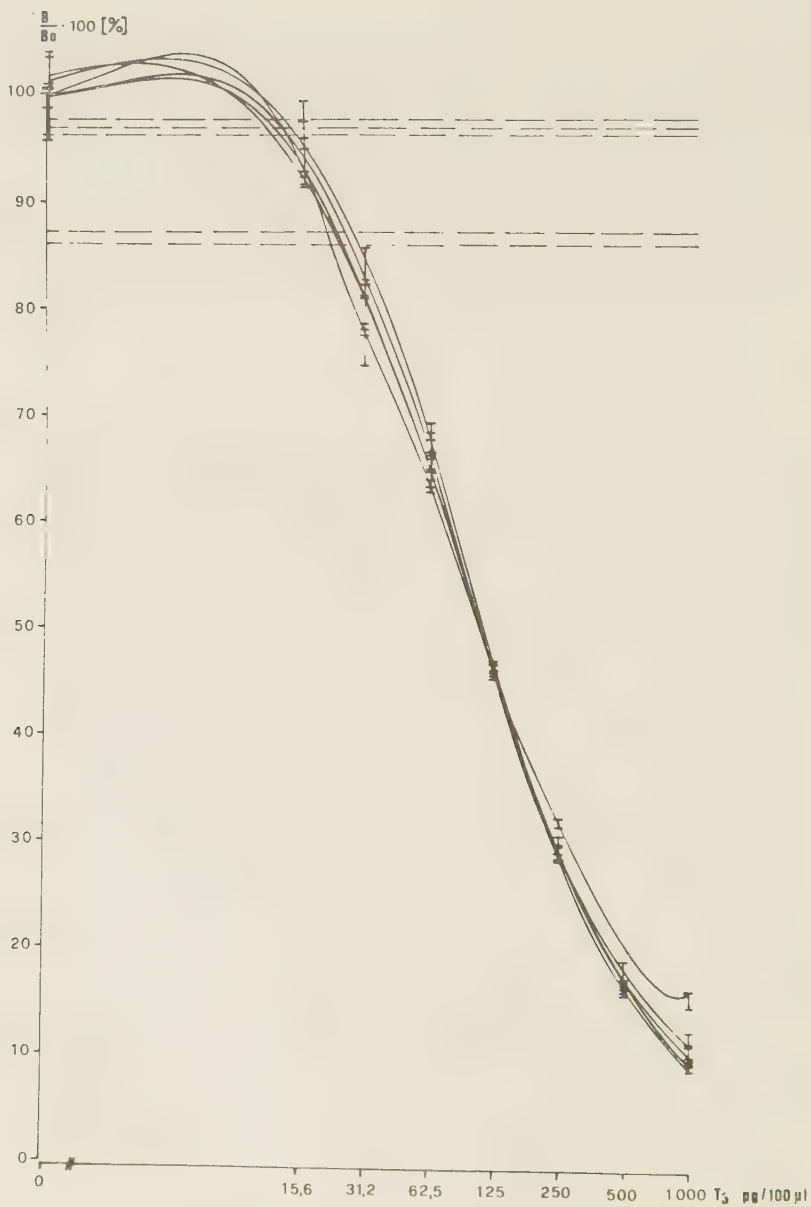
2.3.3.3.2.4. Bound - Free - Trennung

Nach der Inkubation erfolgte die Auftrennung in Antikörper- gebundenen und -freien Anteil des T_3 nach dem Prinzip des T_3 -in vitro-Testes (vgl. 2.3.1.2.): Die Inkubationsansätze mit dem Volumen von nahezu 6 ml wurden dazu quantitativ über 2 ml Sephadex G - 25 superfine-Säulen gepumpt, die mit 0,05 M Natriumbarbitalpuffer, pH 8,6, vorgespült waren. Die Antikörper-gebundene Fraktion des T_3 wurde mit dem gleichen Puffer von der 1. bis zur 28. Minute eluiert und in 10 ml Plastikröhrchen gesammelt.

Der freie Anteil wurde in den darauffolgenden 14 Minuten (4 Minuten Nachwaschserum und 10 Minuten 0,05 M Natriumbarbitalpuffer, pH 8,6) eluiert (Abb. 2). Wegen der Zählgeometrie wurde der erste Peak (Bound) in zweimal 14 Min.-Fraktionen mit je 5,5 ml Volumen unterteilt. Die Bound- und Free-Eluate wurden anschließend an einem Gammameßplatz gezählt, wobei die Zählraten der Free-Fraktion nur zur Kontrolle der Wiederfinderraten des insgesamt eingesetzten radioaktiven T_3 dienten.

2.3.3.3.2.5. Auswertung der T_3 -Meßwerte

Die Impulsraten der Antikörper-gebundenen Fraktionen wurden neben der üblichen Blattschreiberausdruckung gleichzeitig auf einem Lochstreifen festgehalten. Nach Abzug der unspezifischen Bindung N wurden die so ermittelten Impulsraten der Standardeinsätze als Prozentsätze des Standardleerwertes B_0 berechnet. Die Standardeckurve erhielt man, indem auf halblogarithmischem Papier mit der Abszisse $pg/100 \mu l$ und der Ordinate $\frac{B - N}{B_0 - N} \times 100$ die berechneten Prozentwerte der Standards vom Standardleerwert über den entsprechenden Abszissenabschnitten aufgetragen wurden. Unbekannte Serumproben ließen sich dann über deren berechnete Prozentwerte auf der Standardeckurve ablesen. Diese Auswertung konnte wesentlich rationalisiert werden, indem die Meßdaten über Lochstreifen in einen Computer (Siemens 404/3) eingegeben und nach dem Verfahren der Spline Approximation von MARSCHNER und Mitarbeitern (68) direkt ausgewertet wurden. Die Standardeckurven wurden auf diese Weise nach mathematischen und statistischen Kriterien berechnet, über einen Plotter aufgezeichnet und die unbekannten Proben an dieser Eichkurve abgelesen und über einen Schnelldrucker ausgedruckt (Abb. 4). Neben der Zeitersparnis garantiert dieses Vorgehen eine optimale Standardisierung.



3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse zur Methode der T_3 -Bestimmung

Die Präzision und Richtigkeit des beschriebenen Radioimmunoassays für Trijodthyronin wurde durch folgende Verfahren überprüft:

- 3.1.1. - Wiederfinderaten von radioaktiv markiertem T_3
- 3.1.2. - Wiederfinderaten von kaltem T_3 im Serum
- 3.1.3. - Serum-Verdünnungskurven
- 3.1.4. - Kreuzreaktion von T_4 mit dem T_3 -Antiserum
- 3.1.5. - Kreuzreaktion von T_4 im T_3 - Radioimmunoassay
- 3.1.6. - Vergleich mit handelsüblichen T_3 -Standards
- 3.1.7. - Präzision in der Serie und von Tag zu Tag
- 3.1.8. - Untere Nachweisgrenze der Methode

Abb. 4: T_3 -Standardeichkurven

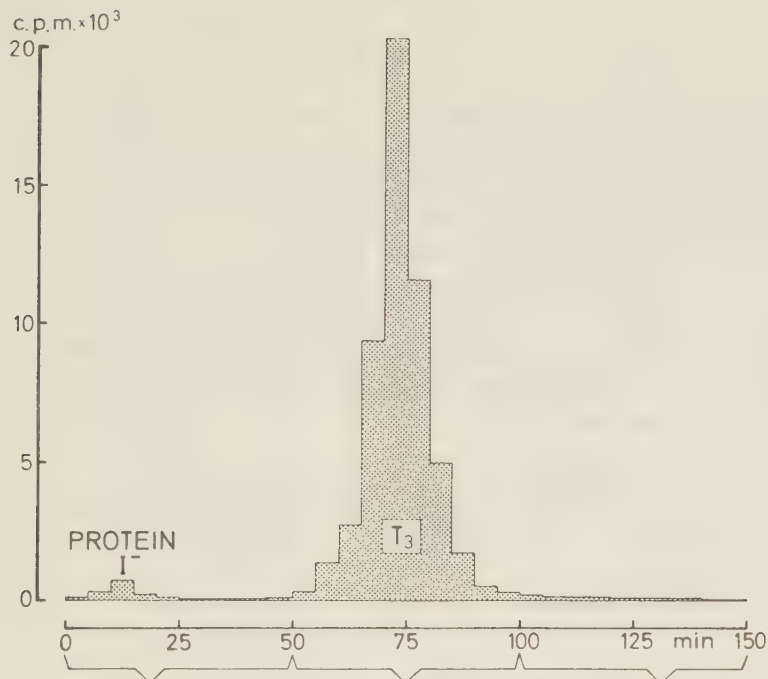
Es sind 5 an verschiedenen Tagen gewonnene Standardeichkurven gezeigt, wie sie über die Computerauswertung mit dem Spline Approximationsverfahren berechnet und aufgezeichnet wurden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen der auf der Abszisse angegebenen Eichstandards durchgeführt und Standardabweichungen angegeben (I). Die gestrichelten waagerechten Linien geben die unteren Nachweisgrenzen der 5 Eichkurven an.

3.1.1. Wiederfinderaten von radioaktiv markiertem T_3

Zur Bestimmung der radioaktiven Wiederfinderaten des isolierten T_3 von den Trennsäulen wurden die Eluate in 3 Fraktionen von der 1.-50. (I), der 50.-100. (II) und der 100.-150. (III) Minute gesammelt und am Gammameßplatz gemessen. Der T_3 -Peak (Fraktion II) wurde danach zu der gesamt eingesetzten Radioaktivität (Summe der Radioaktivitäten der Fraktionen I, II und III) in Beziehung gesetzt (Abb. 5). Die Wiederfinderaten im T_3 -Peak lagen bei Einsatz eines frischen Tracers bei $96,1 \pm 0,4 \%$ ($\bar{x} \pm s$), $n = 15$. Da sich radioaktiv markiertes und unmarkiertes endogenes Trijodthyronin prinzipiell gleich verhalten, konnte mit diesem Test gezeigt werden, daß das zu bestimmende Hormon von der 50. bis 100. Minute nahezu vollständig von der Extraktionssäule eluiert wurde (Abb. 5). Aufgrund dieser reproduzierbaren quantitativen Wiederfindung von T_3 war eine rechnerische Korrektur der Resultate bei der T_3 -Bestimmung mit dem T_3 -Tracer als "internal standard" nicht erforderlich. Die radioaktiven Wiederfinderaten wurden natürlich mit zunehmendem Alter des Tracers aufgrund der Entstehung von Degradationsprodukten geringer. Diese Tracerverunreinigungen wurden mit den Serumproteinen vor dem T_3 -Peak eluiert. Die säulen-chromatographische Extraktion von ausschließlich T_3 bot somit gleichzeitig den Vorteil einer zusätzlichen Reinigung des eingesetzten T_3 -Tracers (vgl. 4.5.).

Abbildung 5: Radioaktive Wiederfinderaten bei der Extraktion des T_3 aus dem Serum

Eingezeichnet ist das Elutionsdiagramm des T_3 -¹²⁵J von den Extraktionssäulen. Der T_3 -Tracer war vorher mit 100 µl Serumprobe inkubiert worden (obere Hälfte der Abbildung). In der unteren Hälfte sind die Impulsraten pro Minute der Eluate bis zur 50. Minute, von der 50. bis 100. und von der 100. bis 150. Minute von 15 parallel beschickten Extraktionssäulen aufgeführt. Die Wiederfinderaten im T_3 -Peak wurden in Prozent zur Gesamtaktivität berechnet, die in 150 Minuten von den Säulen eluiert wurden.



0 - 50. min	50.-100. min	%	100.-150. min
1455	52582	95,70	909
1450	53203	95,54	1029
1527	54739	96,24	663
1482	53635	96,06	716
1364	54011	96,73	750
1303	51896	96,50	574
1425	53341	96,27	637
1476	53643	95,81	867
1369	53775	95,80	991
1414	53489	96,23	680
1355	54071	96,41	656
1361	53941	95,57	1139
1457	53438	96,88	836
1391	53136	96,29	653
1520	53698	96,01	710
		96,07 $\pm$ 0,36	%(mean $\pm$ SD)

3.1.2. Wiederfinderaten von kaltem T_3 im Serum

Zur Bestimmung der kalten Wiederfinderaten wurden einem Hypothyreotenserum (T_3 : 15,0 pg/100 μ l, T_4 : 0,4 μ g/100 ml) die T_3 -Standardlösungen zugesetzt. Von den gemessenen T_3 -Gehalten der Probenansätze wurde der endogene T_3 -Spiegel des Serums (15,0 pg/100 μ l) subtrahiert und mit den eingesetzten T_3 -Standards verglichen. Die Wiederfindung von kaltem T_3 lag im Mittel bei $98,6 \pm 7,3 \%$ ($\bar{x} \pm s$), entsprechend betrug der Regressionskoeffizient zwischen wiedergefundenem und eingesetztem T_3 $b = 1,008$ und der Korrelationskoeffizient $r=0,999$. (vgl. Tab. 2 und Abb. 6)

Eingesetztes T_3 pg/100 μ l		Gemessenes T_3 pg/100 μ l	Wiederfindung der zu- gesetzten T_3 -Standards	
Standard	Serum		pg/100 μ l	%
$\emptyset$	15	15	$\emptyset$	-
15,6	15	28,2	13,2	84,6
31,25	15	45,9	30,9	98,9
62,5	15	81,4	66,4	106,2
125,0	15	141,7	126,7	101,4
250,0	15	263,6	248,6	99,4
500,0	15	519,8	504,8	101,0

$98,6 \pm 7,3\%$

Tabelle 2: Wiederfinderaten von kalten T_3 -Eichstandards im Serum eines hypothyreoten Patienten

Von dem gemessenen T_3 -Gehalt der Proben wurde der endogene T_3 -Spiegel des Serums subtrahiert und in Prozent zur eingesetzten T_3 -Standardmenge berechnet.

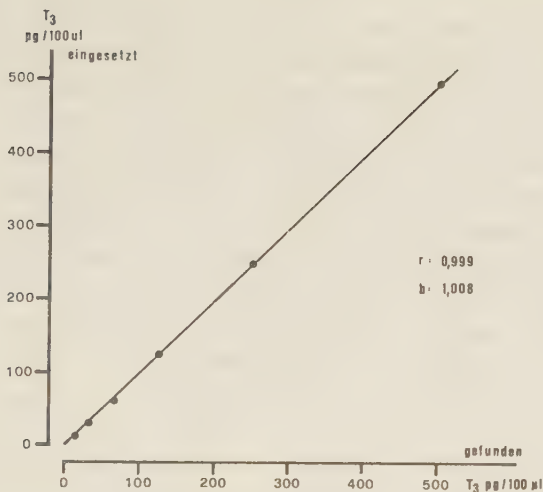


Abbildung 6: Wiederfindung von T₃-Eichstandards im Serum eines hypothyreoten Patienten

Auf der Ordinate sind die eingesetzten T₃-Konzentrationen angegeben, auf der Abszisse die gemessenen T₃-Konzentrationen.

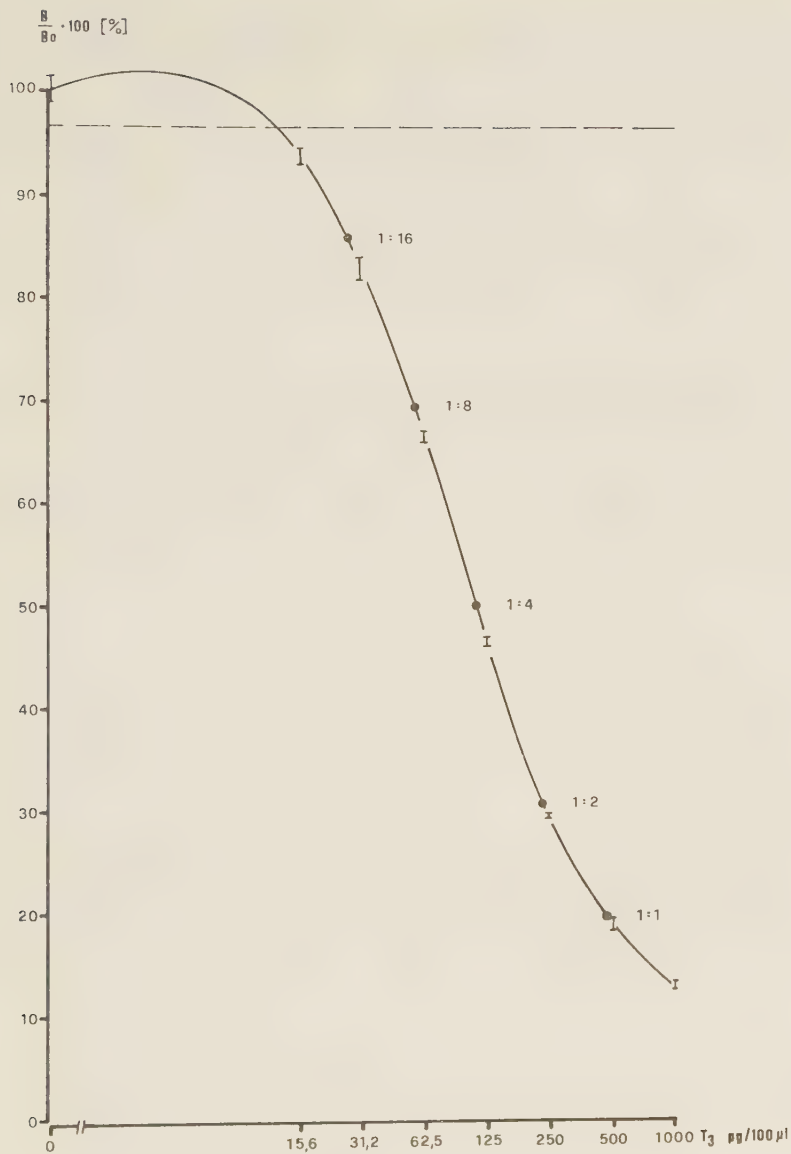
3.1.3. Serum-Verdünnungskurven

Das Serum eines hyperthyreoten Patienten (T₃: 484,7 pg/100 µl, T₄: 14 µg/100 ml) wurde mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, in einer Verdünnungsreihe angesetzt und der T₃-Gehalt in diesen Ansätzen radioimmunologisch gemessen. Die gemessenen T₃-Konzentrationen in den jeweiligen Verdünnungen wurden in Prozent zu denjenigen Konzentrationen berechnet, die, ausgehend von dem unverdünnten hyperthyreoten Serum, gemäß der Verdünnung erwartet wurden (Tab. 3).

Da dieser hohe Ausgangswert des unverdünnten Serums von 484,7 pg/100 μ l in einem ungenauen Teil der Eichkurve abgelesen wurde (vgl. Abb. 7) und somit weniger zuverlässig ist als ein Wert, der aus dem steilen Eichkurvenabschnitt stammt, wurde zur Kontrolle das Ergebnis der T_3 -Bestimmung in einer 1:4-Verdünnung des Serums als Bezugsgröße herangezogen (Tab. 3). Anhand der exakten Parallelität von Eichkurve und Serumverdünnungskurve (Abb. 7, Tab. 3) konnte gezeigt werden, daß dieser T_3 -Radioimmunoassay nicht durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen der Proben, insbesondere auch nicht durch unterschiedliche TBG-Konzentrationen, gestört wird.

Abbildung 7: Verdünnungskurve des Serums eines hyperthyreoten Patienten

Auf der Standardeichkurve wurde der T_3 -Gehalt des unverdünnten Serums (1:1) abgelesen und danach die gemessenen B/B_0 -Raten der verschiedenen Serumverdünnungen gegen die T_3 -Konzentrationen aufgetragen, die sich aus der Verdünnung des Ausgangswertes (unverdünntes Serum) errechneten. Standard-eichkurve und Verdünnungskurve sind praktisch identisch.



Serumver- dünnung	Meßwerte pg/100 µl	"Sollwerte"		Meßwerte in Prozent zum "Sollwert"	
		pg/100 µl		%	
		A	B	A	B
1: 1	484,7	484,7	462,8	100,0	104,5
1: 2	236,5	242,4	231,4	97,6	102,0
1: 4	115,7	121,2	115,7	95,6	100,0
1: 8	59,3	60,2	57,9	98,5	102,3
1:16	28,3	30,3	28,9	97,0	98,0
				97,7 $\pm$ 1,6 x $\pm$ s	101,4 $\pm$ 2,5 x $\pm$ s

Tabelle 3: Serumverdünnungskurve im Vergleich zur T_3 -Standard-
eichkurve

Als "Sollwert" wurde einmal das Ergebnis der Messung des unverdünnten hyperthyreoten Serums zu Grunde gelegt (A), zum anderen der Meßwert der 1:4-Verdünnung des Serums, der im steilen Bereich der Standardeichkurve abgelesen wurde (B).

3.1.4. Kreuzreaktion von T_4 mit dem T_3 -Antiserum

Bei der von uns entwickelten Bestimmungsmethode für T_3 wurde mit der chromatographischen Extraktion des T_3 aus dem Serum gleichzeitig auch das T_4 vom T_3 abgetrennt (Abb. 2). Dennoch interessierte die Frage, ob eine Abtrennung des T_4 von T_3 notwendigerweise durchgeführt werden mußte. Zur Beantwortung dieser Frage überprüften wir die Kreuzreaktion des T_3 -Antikörpers mit dem T_4 . Wir verwendeten dazu einen T_4 -Standard, der vorher chromatographisch gereinigt wurde und damit die Gewähr bot, nicht durch T_3 verunreinigt zu sein.

3.1.4.1. Herstellung eines T_3 -freien T_4 -Standards

Zur Abtrennung einer möglichen T_3 -Verunreinigung des T_4 wurde 1 mg des T_4 rasch in 0,1 N NaOH gelöst (vgl. 2.1.2.), auf eine

5 ml - Sephadex G - 25 superfine Säule aufgetragen und anschließend mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 11,5, eluiert. Auf einer zweiten Säule wurde zur Kontrolle parallel radioaktives T_3 und T_4 chromatographiert, um den T_4 -Elutionspeak zu erfassen (vgl. Abb. 2). Die Fraktion mit dem höchsten T_4 -Gehalt wurde mittels der kompetitiven Proteinbindungsanalyse für T_4 (2.3.1.1.) gemessen und zur Erstellung einer T_4 -Standarddeichkurve verwandt. Folgende T_4 -Standards kamen zur Anwendung: 80 -, 40 -, 20 - und 10 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 11,5.

3.1.4.2. Kreuzreaktion des gereinigten T_4 mit dem T_3 -Antikörper

Inkubationsgemische von T_3 -Nullstandards mit T_3 -Tracer wurden analog dem Verfahren der säulenchromatographischen Extraktion des T_3 behandelt. Zu den gesammelten T_3 -Peaks wurden jetzt die gereinigten T_4 -Standardlösungen (10 bis 80 $\text{ng}/100 \mu\text{l}$) zugegeben. Danach erfolgte der beschriebene Radioimmunoassay mit Um-puffern, Inkubation mit T_3 -Antikörperlösung und die Bound/Free-Trennung (vgl. 2.3.3.3.2.). Die gemessenen T_3 -Werte repräsentierten die Kreuzreaktion des T_4 mit dem T_3 -Antikörper. Diese schwankte in Abhängigkeit vom eingesetzten T_4 zwischen 0,09 und 0,18% (vgl. Tab. 4). Die Steilheit der " T_4 -Standardkurve" war dabei deutlich geringer als die der T_3 -Standarddeichkurve (Abb. 8). Diese unterschiedliche Steilheit macht eine Kontamination des T_4 mit T_3 wenig wahrscheinlich, sie ist vielmehr auf eine geringe Kreuzreaktion von T_4 mit dem T_3 -Antikörper zurückzuführen. Nimmt man die T_4 -Konzentration im Serum von 20 und 10 $\text{ng}/100 \mu\text{l}$ als die in der Praxis relevanten Bezugsgrößen zur Grundlage, so würden in einem Assaysystem, das keine Abtrennung von T_4 vornimmt, etwa 0,17% des T_4 als T_3 in die Bestimmung eingehen (Tab. 4). Da T_4 normalerweise in einer etwa 60-fach höheren Konzentration als T_3 im Serum vorliegt, würde sich dann ein Fehler von etwa 10 % ergeben.

Eingesetztes T_4 ng/100 μ l	gemessener (T_3 -Gehalt "fiktiver") pg/100 μ l	Kreuzreaktion von T_4 in %
80	68	0,09
40	55	0,14
20	33	0,17
10	18	0,18

Tabelle 4: Kreuzreaktion von T_3 -freien T_4 -Standards mit dem
 T_3 -Antikörper

Die Kreuzreaktion berechnet sich als fiktiver T_3 -
Gehalt der Proben in Prozent zum eingesetzten T_4 .

3.1.5. Kreuzreaktion von T_4 im T_3 -Radioimmunoassay

Um den Einfluß von Thyroxin auf den in dieser Arbeit entwickelten T_3 -Radioimmunoassay auszutesten, wurden die säulenchromatographisch gereinigten T_4 -Standards direkt in die T_3 -Bestimmung eingegeben (Abb. 8). Selbst bei Eingabe von insgesamt 80 ng T_4 in den Assay, was einem exzessiven T_4 -Gehalt eines Serums von 80 μ g/100 ml entspricht, lag der gemessene " T_3 "-Wert deutlich unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 15 pg/100 μ l T_3 .

Hieraus errechnet sich eine Kreuzreaktion von T_4 im T_3 -Radioimmunoassay von weniger als 0,02 %. Bei einer primären Kreuzreaktion des T_4 mit dem T_3 -Antikörper von etwa 0,17 % zeigt dieser Befund an, daß bei der von uns entwickelten Methode auch exzessiv hohe T_4 -Mengen während des säulenchromatographischen Extraktionsschrittes quantitativ vom T_3 abgetrennt wurden und das Ergebnis der radioimmunologischen T_3 -Bestimmung nicht stört.

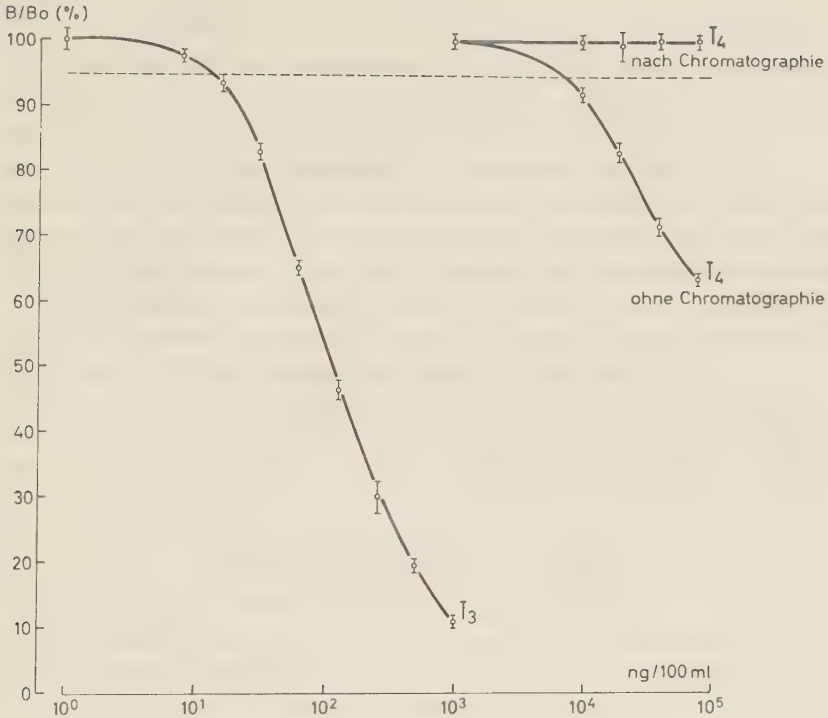


Abbildung 8: Kreuzreaktion von T_4 im Radioimmunoassay T_3

Aufgezeichnet ist die Verdrängung des T_3 -Tracers von T_3 -Antikörper durch steigende Konzentrationen von

- T_3 (T_3 -Standardkurve),
- vom T_3 -freien T_4 , das direkt mit T_3 -Antikörper inkubiert wurde (T_4 ohne Chromatographie) und schließlich
- vom T_3 -freien T_4 nach dem chromatographischen Extraktionsschritt, wie er bei der Serum- T_3 -Bestimmung prinzipiell durchgeführt wurde (vgl. 2.3.3.2.).

3.1.6. Vergleich mit handelsüblichen T_3 -Eichstandards

Immer mehr kommerziell vertriebene Testkits für die T_3 -Bestimmung werden heute von der Industrie angeboten. Wie im Kapitel 4.1. noch aufgezeigt wird, ist der Vergleich der mit verschiedenen Bestimmungsmethoden gemessenen T_3 -Spiegel aufgrund systematischer Fehler bei der Messung im unextrahierten Serum problematisch. Um aber schon eine fehlerhafte Eichung der verschiedenen Radioimmunoassays ausschließen zu können, wurden die T_3 -Eichstandards eines Testkits (Fa. Byk - Mallinckrodt, Dietzenbach) die in T_3 -freiem "Nullserum" angesetzt waren, mit unserem Verfahren überprüft. Dabei fand sich eine exakte Übereinstimmung mit der von uns eingewogenen Standard Eichkurve:

Für den 100 pg/100 μ l T_3 -Standard fanden wir	99 pg/100 μ l,
für den 200 pg/100 μ l T_3 -Standard	200 pg/100 μ l,
für den 400 pg/100 μ l T_3 -Standard	402 pg/100 μ l.

3.1.7. Präzision in der Serie und von Tag zu Tag

Ein bei -25°C aufbewahrtes gepooltes Kontrollserum (2.1.7.) wurde sowohl über 20 parallel beschickte Säulen auf seinen T_3 -Gehalt überprüft, als auch in 20 Durchgängen an verschiedenen Tagen über einen Zeitraum von 5 Monaten gemessen. Für die parallelen Ansätze (Präzision in der Serie) ergab sich bei einem T_3 -Gehalt von $102,8 \pm 6,7$ pg/100 μ l ($\bar{x} \pm s$) ein Variationskoeffizient von 6,5%. Der Interassay-Variationskoeffizient (Präzision von Tag zu Tag) war bei einem Mittelwert für T_3 von $106,8 \pm 8,9$ pg/100 μ l ($\bar{x} \pm s$) mit 8,4% ebenfalls zufriedenstellend.

3.1.8. Untere Nachweisgrenze der Methode

Die untere Nachweisgrenze des T_3 -Radioimmunoassays, die sich als dreifache Standardabweichung der B_0 -Raten, d.h. nur bei Einsatz von T_3 -Tracer ohne kaltes T_3 berechnet (58), lag bei 15 pg/100 μ l.

3.2. Klinische Ergebnisse

3.2.1. T₃ - Spiegel im Serum von Normalpersonen

Zur Bestimmung des Normalbereiches der T₃-Spiegel wurden die Seren von 24 männlichen und 12 weiblichen gesunden Patienten mit palpatorisch normal großer Schilddrüse untersucht. Frauen unter Östrogentherapie (Ovulationshemmer) wurden ausgeschlossen. Die T₄-Spiegel dieses Normalkollektivs betrugen im Mittel $6,5 \pm 1,1$ µg/100 ml ($\bar{x} \pm s$), die Werte des sog. freien T₃-¹²⁵J (T₃U, 2.3.1.2.) $36,6 \pm 3,9$ % ($\bar{x} \pm s$). Sie lagen damit innerhalb der Normalbereiche, die früher in unserem Labor ermittelt worden waren. Der Index der freien Schilddrüsenhormone (fT₄ - Index, 2.3.1.3.) betrug bei der Kontrgruppe $2,4 \pm 0,6$ ($\bar{x} \pm s$) und lag damit gleichfalls in dem für die Klinik angegebenen Normalbereich von 2,0 bis 3,8. Auch die basalen TSH-Spiegel (2.3.1.4.) und die Anstiege des TSH nach intravenöse TRH-Gabe von 200 µg TRH (2.3.1.5.) entsprachen mit $1,7 \pm 0,8$ µE/ml, bzw. $9,3 \pm 5,1$ µE/ml ($\bar{x} \pm s$) den früher bei anderen Kontrollgruppen gemessenen Mittelwerten. Die radioimmunologisch bestimmten T₃-Spiegel im Serum lagen im Mittel bei 113 ± 17 pg/100 µl ($\bar{x} \pm s$). Daraus berechnete sich ein Normalbereich von 80 - 150 pg/100 µl ($\bar{x} \pm 2s$). Bei einem mittleren Quotienten der Serumspiegel von T₃ zu T₄ von $17,9 \pm 4,0 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) ergab sich für das untersuchte Kontrollkollektiv ein mittleres Verhältnis der T₃ zu T₄-Spiegel im Serum von etwa 1 : 60 auf Gewichtsbasis, bzw. 1 : 50 auf molarer Basis. Ein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Probanden ließ sich nicht erkennen (Abb. 9).

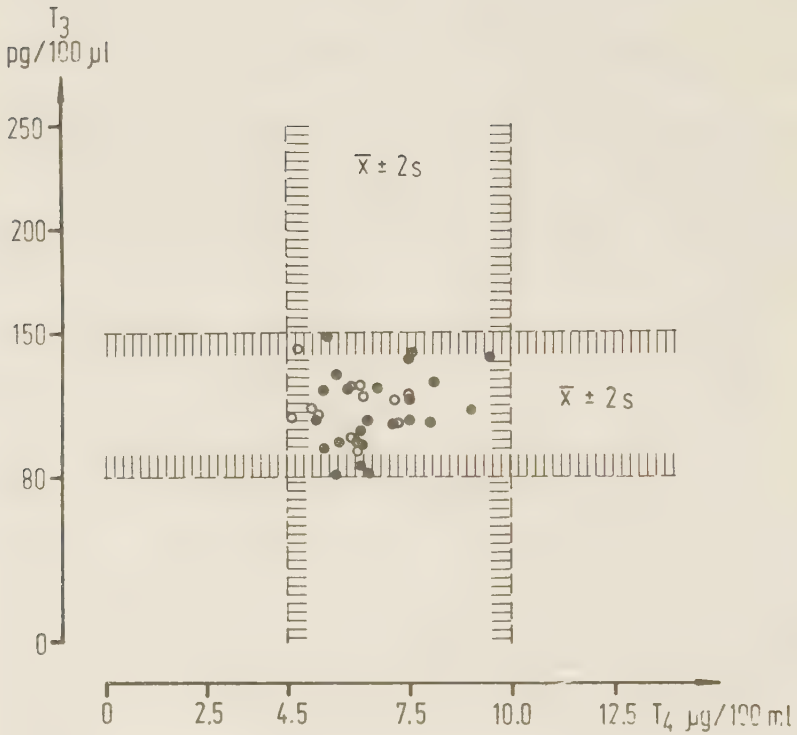


Abbildung 9: Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Normalpersonen

Eingezeichnet sind die Serumspiegel von 12 weiblichen (o) und 24 männlichen Kontrollpersonen (•). Die gestrichelten Linien geben die Grenzen der Normalbereiche für T_3 (Ordinate) und T_4 (Abszisse) an, wobei der Normalbereich für T_4 einem größeren, früher untersuchten Kontrollkollektiv (88) entstammt, der des T_3 aber der von uns untersuchten Kontrollgruppe.

3.2.2. Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Patienten mit Schilddrüsenunterfunktion

Ein Schilddrüsenhormonmangel kann einmal auf der Unfähigkeit der Schilddrüse beruhen, genügend Schilddrüsenhormon zu bilden (primäre, thyreogene Hypothyreose) und zum anderen auf einer ungenügenden Stimulation der gesunden Schilddrüse durch das hypophysäre Hormon Thyreotropin (TSH), das seinerseits der Regulation durch das hypothalamische Thyreotropin-releasing-Hormon (TRH) untersteht. In diesem Fall spricht man von einer sekundären, hypophysären oder unter Umständen hypothalamischen Hypothyreose. Bei der primären Hypothyreose kann die Schilddrüse trotz vermehrter thyreotroper Stimulation nicht in ausreichender Menge Schilddrüsenhormone bereitstellen. Definitionsgemäß sind in diesem Fall die zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegel erniedrigt und die TSH-Spiegel erhöht. Im Gegensatz dazu sind die TSH-Spiegel bei hypophysär-hypothalamischen Erkrankungen im Vergleich zu den erniedrigten peripheren Schilddrüsenhormonspiegeln inadäquat niedrig oder überhaupt nicht nachweisbar (81). Eine sichere Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Hypothyreose ist demnach nur anhand der TSH-Spiegel möglich.

3.2.2.1. Primäre Hypothyreose

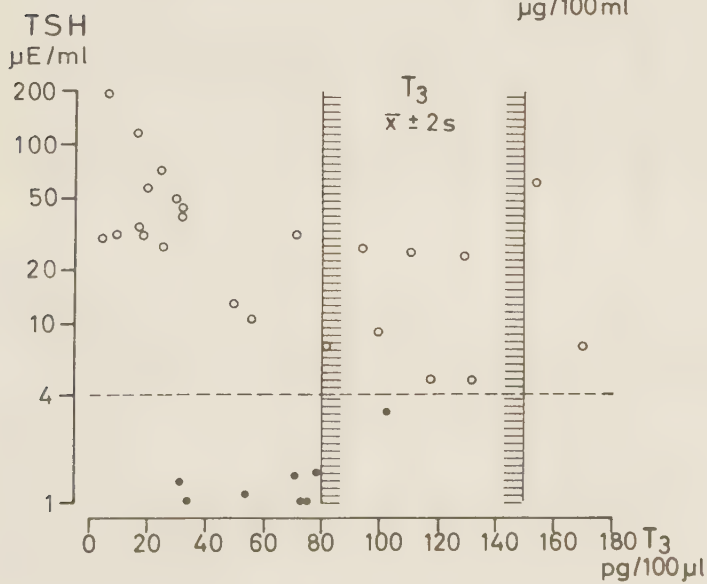
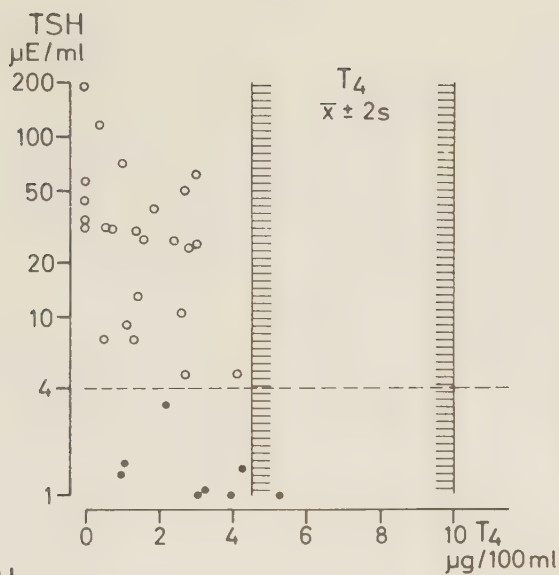
Es wurden 24 Patienten mit primärer Hypothyreose untersucht. Die basalen TSH-Spiegel im Blut waren mit einem Mittelwert von $29,9 \pm 27,1 \mu\text{E/ml}$ ($\bar{x} \pm s$) definitionsgemäß erhöht. Sie lagen zwischen 4,7 und 192 $\mu\text{E/ml}$. Die T_4 -Spiegel waren erwartungsgemäß erniedrigt. Sie betrugen im Mittel $1,47 \pm 1,45 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) und umfaßten einen Bereich von 0,1 bis 4,1 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Der Mittelwert der gemessenen T_3 -Spiegel war mit $61,9 \pm 51,2 \text{ pg}/100 \mu\text{l}$ ($\bar{x} \pm s$) gegenüber dem Normalkollektiv ebenfalls deutlich erniedrigt. Im einzelnen waren die T_3 -Spiegel jedoch nur bei 15 Patienten erniedrigt, 7 Patienten hatten normale T_3 -Spiegel und bei zwei Patienten wurden sogar T_3 -Spiegel oberhalb des Normalbereiches gefunden (Abb. 10 und 11). Der T_3/T_4 -Quotient lag im Mittel bei einem Wert von 94,6.

3.2.2.2. Sekundäre Hypothyreose

Acht Patienten mit einer sekundären Hypothyreose wurden untersucht. Sie hatten vornehmlich gesicherte hormoninaktive Hypophysentumoren. Die sekundären Hypothyreosen konnten an den niedrigen basalen TSH-Spiegeln mit einem Mittelwert von $1,34 \pm 0,8 \mu\text{E/ml}$ ($\bar{x} \pm s$) und dem unzureichenden Anstieg nach Stimulation mit TRH auf im Mittel $2,68 \pm 2,0 \mu\text{E/ml}$ ($\bar{x} \pm s$) von einem primären Schilddrüsenhormonmangel unterschieden werden. Entsprechend dieser ungenügenden Stimulation der Schilddrüse durch TSH lag der Mittelwert für T_4 mit $2,93 \pm 1,52 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) unter dem Normalbereich. Lediglich ein Patient wies trotz eines TSH-Mangels ($0,8 \mu\text{E/ml}$) einen eben noch im Normalbereich liegenden T_4 -Spiegel von $5,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ auf. Der mittlere T_3 -Spiegel dieser Patienten war mit $65 \pm 24 \text{ pg}/100\mu\text{l}$ ($\bar{x} \pm s$) deutlich erniedrigt. Nur ein Patient hatte einen normalen T_3 -Spiegel von $102 \text{ pg}/100 \mu\text{l}$. Die T_3 -Spiegel waren bei den sekundären Hypothyreosen also deutlicher erniedrigt als bei den primären Hypothyreosen mit erhöhten TSH-Spiegeln (Abb. 10). Dagegen lagen die T_4 -Spiegel im Mittel mit $2,93 \pm 1,52 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) höher als bei den primären Hypothyreosen mit $1,47 \pm 1,45 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) (Abb. 10). Der T_3/T_4 - Quotient lag mit $30,3 \pm 17$ ($\bar{x} \pm s$) deutlich über dem des Normalkollektivs von $17,9 \pm 4$ ($\bar{x} \pm s$).

Abbildung 10: T_3 -, T_4 - und basale TSH-Spiegel bei Patienten
mit primärer - und sekundärer Hypothyreose

In der oberen Hälfte der Abbildung sind die T_4 -Spiegel, in der unteren Hälfte die T_3 -Spiegel gegen die logarithmisch aufgetragenen basalen TSH-Spiegel bei Patienten mit primärer (o) und sekundärer (●) Hypothyreose aufgezeichnet. Die Normalbereiche für T_3 und T_4 sind durch schraffierte senkrechte Balken eingegrenzt, die obere Grenze der TSH-Spiegel von Normalpersonen ist mit der waagerechten gestrichelten Linie gekennzeichnet.



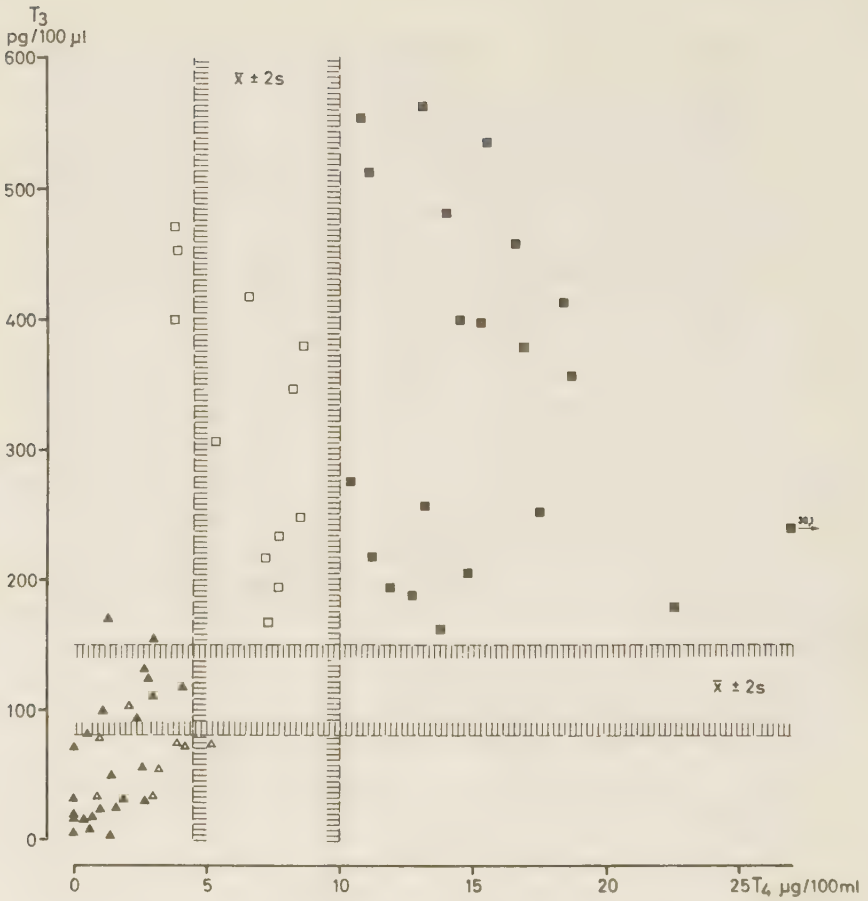


Abbildung 11: Serumspiegel von T₃ und T₄ bei Patienten mit

Hypo- und Hyperthyreose

Aufgezeichnet sind die T₃- und T₄-Spiegel bei primärer Hypothyreose (▲), sekundärer Hypothyreose (△), der "klassischen" Hyperthyreose (■) und der T₃-Hyperthyreose (□). Die schraffierten Balken begrenzen die Normalbereiche für T₃ und T₄. Das geschlossene Rechteck umfaßt damit den gemeinsamen Normalbereich beider Schilddrüsenhormone.

3.2.3. Serumspiegel von T_3 und T_4 bei Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion

Bei einer Hyperthyreose produziert definitionsgemäß die Schilddrüse unabhängig von der hypophysär-hypothalamischen Kontrolle vermehrt Schilddrüsenhormone. Dementsprechend wird eine Hyperthyreose gesichert durch den Nachweis von erhöhten Schilddrüsenhormonspiegeln im Serum und einer supprimierten TSH-Sekretion. Bei der klassischen Hyperthyreose sind demnach Gesamt- T_4 , T_3 -in vitro-Test und folglich der Index der freien Schilddrüsenhormone erhöht, die basalen TSH-Spiegel sind supprimiert und steigen beim TRH-Test nicht an. In der Praxis werden aber immer wieder Patienten mit klinisch ausgeprägter hyperthyreoter Symptomatik beobachtet, bei denen die konventionelle Labordiagnostik mit normalem Gesamt- T_4 und T_3 -in vitro-Test die klinische Verdachtsdiagnose einer Hyperthyreose nicht bestätigt. Die supprimierten, beim TRH-Belastungs-Test nicht stimulierbaren TSH-Spiegel dagegen wiesen auf eine Hyperthyreose hin. Erst durch den Nachweis von erhöhten T_3 -Spiegeln kann bei diesen Patienten eine Sonderform der Hyperthyreose, die sogenannte T_3 -Hyperthyreose abgegrenzt werden (43,47,48,57,103). Zur Diagnose einer T_3 -Hyperthyreose sollten nach Wahner (110) folgende 5 Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1.: Es müssen klinisch die Zeichen einer Hyperthyreose vorliegen.
- 2.: Das Gesamt- T_4 darf nicht über die Norm erhöht sein.
- 3.: Die spezifisch Schilddrüsenhormon bindenden Proteine, vor allem das TBG müssen normal sein, abzulesen an einem normalen T_3 -in vitro-Test.
- 4.: Durch die erhöhten Schilddrüsenhormonspiegel muß die TSH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens supprimiert sein, was durch einen fehlenden Anstieg der TSH-Spiegel im Serum beim TRH-Belastungstest nachgewiesen wird.
- 5.: Die T_3 -Spiegel müssen erhöht sein.

3.2.3.1. Klassische Hyperthyreose

Von insgesamt 33 untersuchten Patienten mit der klinischen Symptomatik einer Hyperthyreose und nachgewiesener Suppression der TSH-Sekretion konnten wir bei 21 Patienten erhöhte Gesamt- T_4 -Spiegel im Serum und erhöhte Werte beim T_3 -in vitro-Test nachweisen. Die T_4 -Spiegel lagen zwischen 10,4 und 30,1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, im Mittel bei $15,4 \pm 4,5\text{ } \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$), die Werte des T_3 -in vitro-Tests bei $57,6 \pm 22,9\%$. Entsprechend war der Index der freien Schilddrüsenhormone mit $10,6 \pm 7,5$ ($\bar{x} \pm s$) erhöht. Die radioimmunologische Bestimmung der zugehörigen T_3 -Spiegel ergab für alle 21 Patienten gleichfalls Werte, die oberhalb des Normalbereiches für T_3 lagen. Die gemessenen T_3 -Werte reichten von 162 bis 564 $\text{pg}/100\text{ }\mu\text{l}$, sie lagen im Mittel bei $344 \pm 137\text{ } \text{pg}/100\text{ }\mu\text{l}$ ($\bar{x} \pm s$) (Abb. 11). Wie an dem Mittelwert der bei diesen Patienten berechneten T_3/T_4 -Quotienten von $24,2 \pm 12,1 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) abzulesen ist, war das Verhältnis von T_3 zu T_4 im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen mit $17,9 \pm 4,0 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) leicht zugunsten des T_3 verschoben.

3.2.3.2. T_3 -Hyperthyreose

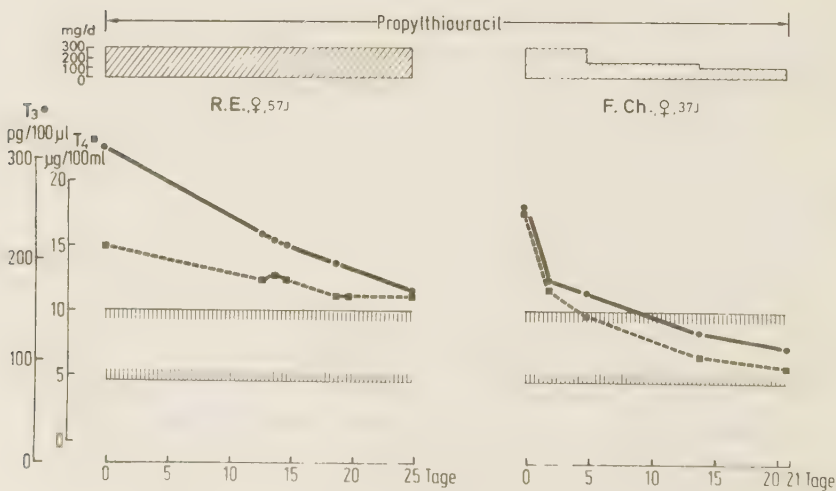
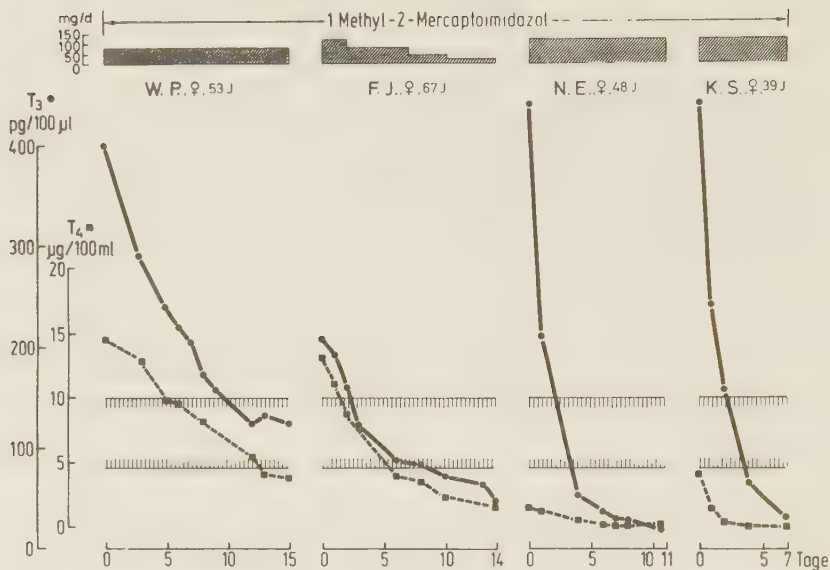
Von den übrigen 12 klinisch hyperthyreoten Patienten mit fehlendem Anstieg der TSH-Spiegel beim TRH-Test lagen bei 9 Patienten die T_4 -Spiegel innerhalb des Normalbereiches für T_4 , bei 3 Patienten waren sie sogar erniedrigt (Abb. 11). Der T_4 -Mittelwert entsprach mit $6,6 \pm 1,9\text{ } \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) dem der schilddrüsengesunden Kontrollgruppe von $6,5 \pm 1,1\text{ } \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$). Die Werte des T_3 -in vitro-Testes waren im Mittel mit $34,5 \pm 8,6\%$ ($\bar{x} \pm s$) gleichfalls normal. Die T_3 -Spiegel der 12 Patienten waren sämtlich erhöht, sie lagen im Mittel bei $320 \pm 106\text{ } \text{pg}/100\text{ }\mu\text{l}$ ($\bar{x} \pm s$). Sie entsprachen damit den T_3 -Spiegeln, die bei den Patienten mit klassischer Hyperthyreose gemessen wurden (Abb. 11). Diese 12 Patienten erfüllten damit die Kriterien der T_3 -Hyperthyreose. Die isolierte T_3 -Mehrproduktion spiegelt sich in dem hohen T_3/T_4 -Quotienten von $57,6 \pm 37,2 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) wieder.

3.2.4. Änderung der Schilddrüsenhormonspiegel unter anti-thyroidaler Behandlung der "klassischen" Hyperthyreose und der T_3 -Hyperthyreose

Die Behandlung der Hyperthyreose ist darauf ausgerichtet, die überschießende Hormonsynthese und -sekretion der Schilddrüse zu senken und zu normalisieren. Als Standardtherapeutika werden heute fast ausschließlich die vom Thioharnstoff abgeleiteten Verbindungen wie Methimazol, Carbimazol und Propylthiouracil eingesetzt. Die Wirkung dieser Thyreostatika beruht auf der Hemmung der Organifizierung des in die Schilddrüse aufgenommenen anorganischen Jodids (30,113) (vgl. Abb. 1). Darüber hinaus wird dem Propylthiouracil zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die periphere Konversion von T_4 zu T_3 zugeschrieben (1,24,25,63,79).

3.2.4.1. Vergleich der Wirkung von Methimazol und Propylthiouracil auf die T_3 - und T_4 -Spiegel

Bei 4 Patienten mit klassischer Hyperthyreose und bei 2 Patienten mit T_3 -Hyperthyreose konnten wir engmaschig die Veränderungen der T_3 - und T_4 -Spiegel während der Therapie mit 1 Methyl-2-Mercaptoimidazol = Methimazol (Favistan^R) und Propylthiouracil (Propycil^R) beobachten und die Bedeutung der T_3 -Bestimmung für die Verlaufskontrolle der antithyroidalen Therapie überprüfen. Dabei interessierte uns vor allem die Frage, ob eine unterschiedliche Wirkung auf die T_3 und T_4 -Spiegel erkennbar wird und ob eine unterschiedliche Effizienz eines der beiden Thyreostatika besteht. Wie die Abbildung 12 erkennen läßt, zeigten die beiden Patienten W.P. und F.J. mit klassischer Hyperthyreose unter der Behandlung mit Methimazol einen nahezu parallelen Abfall von T_3 und T_4 . Bei den beiden Patienten mit T_3 -Hyperthyreose (N.E. und K.S.) fielen unter Methimazol die T_3 -Spiegel gegenüber T_4 deutlich steiler ab. Dieses Phänomen eines unterschiedlich steilen Abfalls der T_3 -Spiegel bei klassischer Hyperthyreose und T_3 -Hyperthyreose läßt sich



damit erklären, daß bei hohen T_4 -Spiegeln (klassische Hyperthyreose) vermehrt T_3 durch periphere Konversion aus T_4 entstehen kann. Umgekehrt kann bei niedrigen T_4 -Spiegeln (T_3 -Hyperthyreose) nur wenig T_3 aus T_4 durch Konversion gebildet werden, so daß bei einer Blockierung der Synthese und Sekretion der Schilddrüse durch Methimazol T_3 nahezu mit der Halbwertszeit abfallen kann (Abb. 12; vgl. 3.2.9.1., Abb. 16). Ein auffälliger Unterschied in der Änderung der Schilddrüsenhormonspiegel bei der Behandlung der klassischen Hyperthyreose mit Methimazol oder Propylthiouracil ließ sich nicht aufzeigen. Bei den mit Propylthiouracil behandelten Patienten R.E. und F.Ch. fielen die T_3 - und T_4 -Spiegel annähernd parallel ab (Abb. 12). Ein konversionshemmender Effekt des Propylthiouracils war damit bei unseren beiden Patienten nicht zu bestätigen. Bei Hemmung der peripheren Konversion von T_4 zu T_3 hätten die T_3 -Spiegel bei der klassischen Hyperthyreose unter Propylthiouracil ähnlich steil abfallen müssen wie bei den T_3 -Hyperthyreosen (s.o.). Wahrscheinlich war für den Nachweis einer Hemmung der peripheren Konversion bei den beiden Patienten die Propylthiouracildosis von 300 mg täglich zu gering. Ein auffälliger Unterschied in der Wirkung der beiden Thyreostatika konnte bei der geringen Anzahl der behandelten Patienten nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 12: Änderung der T_3 - und T_4 -Spiegel bei hyperthyreoten Patienten unter antithyreoidaler Therapie mit Methimazol und Propylthiouracil

Aufgezeichnet ist der Abfall der Serumspiegel von T_3 (●) und T_4 (■),

1. unter der Behandlung mit Methimazol (obere Hälfte der Abbildung) bei 2 Patienten mit klassischer Hyperthyreose (W.P. und F.P.) und 2 Patienten mit T_3 -Hyperthyreose (N.E.) und K.S.),
2. unter der Behandlung mit Propylthiouracil (untere Hälfte) bei 2 Patienten mit klassischer Hyperthyreose. Die gemeinsamen Normalbereiche von T_3 und T_4 sind durch waagerechte Balken eingegrenzt. Zusätzlich sind die individuell unterschiedlichen täglich applizierten Dosen (mg/d) angegeben.

3.2.5. Schilddrüsenhormonspiegel bei dekompensierten autonomen Adenomen

Autonome Adenome der Schilddrüse sind Bezirke, die meist als Knoten tastbar sind, in denen autonom, d.h. unabhängig von der hypophysär-hypothalamischen Kontrolle, Schilddrüsenhormone produziert werden. Nach nuklearmedizinischen Kriterien erfolgt eine Einteilung in kompensierte und dekompensierte autonome Adenome. Überschreitet die Hormonproduktion dieses Knotens eine gewisse Grenze, wird das TSH supprimiert und dadurch das den Knoten umgebende Gewebe ruhiggestellt. Szintigraphisch kommt nur der Knoten, nicht aber das ihn umgebende Schilddrüsengewebe zur Darstellung (dekompensiertes autonomes Adenom).

Beim kompensierten autonomen Adenom reicht die Schilddrüsenhormonproduktion des Adenoms nicht zu einer vollständigen TSH-Suppression aus. Szintigraphisch stellt sich dieser Knoten isoliert erst dar, wenn z.B. durch exogene T_3 -Gabe die TSH-Suppression vollständig wird und das paranoduläre Gewebe im Gegensatz zum knotigen Bezirk aufhört, radioaktives Jod zu speichern.

Definitionsgemäß läßt sich beim kompensierten autonomen Adenom das TSH im TRH-Test stimulieren, umgekehrt ermöglicht die TSH Suppression beim dekompensierten autonomen Adenom keinerlei Stimulierbarkeit des TSH im TRH-Test, was nicht ohne weiteres mit einer Hyperthyreose gleichgesetzt werden darf. Hier ermöglicht erst die Bestimmung der Schilddrüsenhormonspiegel die Beurteilung der aktuellen Schilddrüsenfunktion.

Wir bestimmten bei 4 Patienten mit dekompensiertem autonomen Adenom die T_3 und T_4 -Spiegel (Abb. 13). Zwei der untersuchten Patienten hatten eine klassische Hyperthyreose mit erhöhten T_3 - und T_4 -Spiegeln. Bei einem Patienten wurde ein grenzwertig erhöhter T_3 -Spiegel von 168 pg/100 μ l und ein normaler T_4 -Spiegel von 7,3 μ g/100 ml als Ausdruck einer möglichen T_3 -Hyperthyreose gefunden und der 4. Patient zeigte normale T_3 - und T_4 -Spiegel als Zeichen einer euthyreoten Stoffwechsellaage ("euthyreote Autonomie").

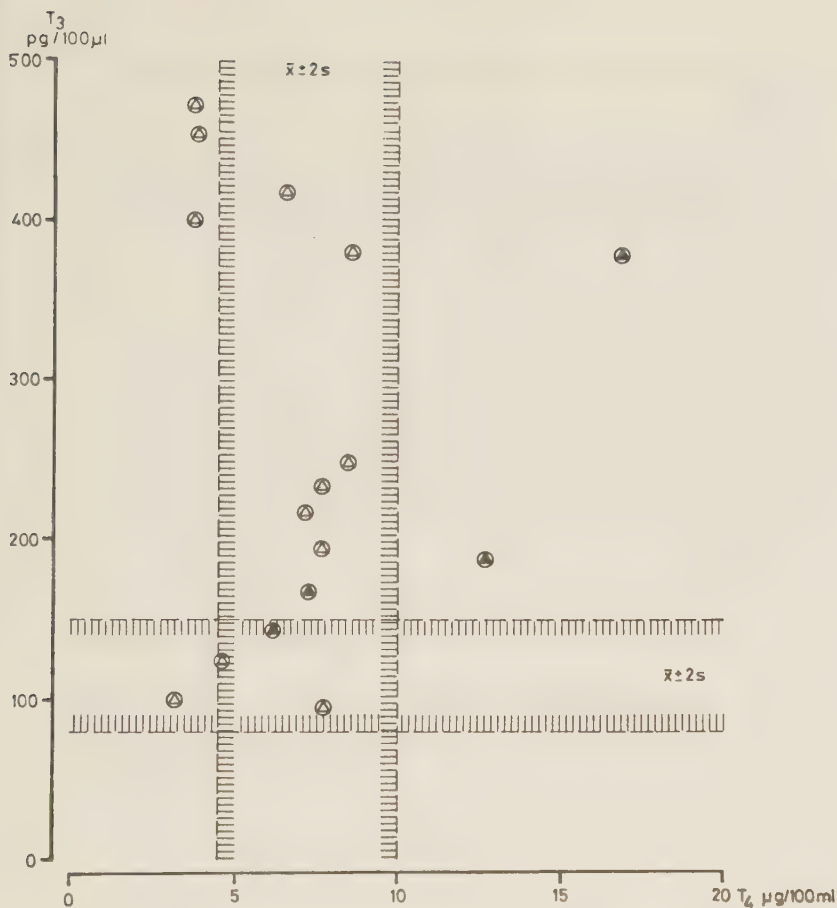


Abbildung 13: Schilddrüsenhormonspiegel von T_3 und T_4 bei de-
kompensierten autonomen Adenomen und endokrinen
Ophthalmopathien

Aufgezeichnet sind die T_3 - und T_4 -Spiegel der dekompen-
sierten autonomen Adenome (●) und der endokrinen Ophthalmopathien
(⊙). Die Normalbereiche für T_3 und T_4 sind durch die gestrich-
elten Balken gekennzeichnet.

3.2.6. Schilddrüsenhormonspiegel bei endokriner Ophthalmopathie

Bei dem klassischen Krankheitsbild des Morbus Basedow sind als Ausdruck der Hyperthyreose die Gesamt- T_4 -Spiegel im Serum erhöht, entsprechend dazu die TSH-Spiegel supprimiert und durch TRH nicht stimulierbar.

Schwierigkeiten kann allerdings die Beurteilung der Schilddrüsenfunktion bei Patienten mit Ophthalmopathie bereiten, bei denen die supprimierten TSH-Spiegel auf eine Hyperthyreose hinweisen, die T_4 -Spiegel aber normal liegen. Zugrundeliegen kann eine T_3 -Hyperthyreose oder eine persistierende Suppression nach abgelaufener oder phasenhaft verlaufender Hyperthyreose. Für die richtige Diagnosestellung hilft auch hier die T_3 -Bestimmung weiter.

Von insgesamt 12 untersuchten, nicht vorbehandelten Patienten mit endokriner Ophthalmopathie (s. Abb. 13), mit supprimierten TSH-Spiegeln, aber normalem, bzw. bei 4 Patienten sogar erniedrigtem T_4 , waren bei 9 Patienten die T_3 -Spiegel mit Werten zwischen 195 und 472 pg/100 μ l erhöht. Es handelte sich somit um T_3 -Hyperthyreosen. Bei 2 Patienten lagen die T_3 - und T_4 -Spiegel innerhalb der Normalbereiche, so daß die TSH-Suppression in diesen Fällen zum Untersuchungszeitpunkt nicht durch eine Schilddrüsenüberfunktion bedingt sein konnte. Als mögliche Ursache ist hier eine phasenhafte Hyperthyreose anzunehmen, die zu einer persistierenden TSH-Suppression geführt hat (73,81). Ein Patient mit endokriner Ophthalmopathie wies sogar bei allerdings normalem T_3 -Spiegel von 100 pg/100 μ l einen erniedrigten T_4 -Spiegel von 3,2 μ g/100 ml auf. Auch in diesem Fall war der supprimierte TSH-Spiegel nicht Ausdruck einer gesteigerten Schilddrüsenhormonproduktion, vielmehr muß auch hier eine persistierende TSH Suppression angenommen werden.

3.2.7. Blande Struma

1969 berichteten HORN und Mitarbeiter (50) über signifikant höhere T_3/T_4 -Quotienten bei Patienten mit blander endemischer Struma, verglichen mit schilddrüsengesunden Personen. Gedeutet wurde dieses Phänomen als eine Substrat (Jod) einsparende Anpassung der Schilddrüse bei vermindertem Jodangebot mit der Nahrung (kompensatorische T_3 -Mehrsekretion) (52). Dieser bereits 1966 von Studer und Greer anhand von Tierversuchen vermutete Mechanismus (31,105) konnte für den Menschen in den letzten Jahren auch in anderen Jodmangelgebieten bestätigt werden (13,64,104,109). Die im Mittel erniedrigten T_4 -Spiegel und erhöhten T_3 -Spiegel bei Patienten mit blander Struma sind damit als ein Versuch der Schilddrüse aufzufassen, das geringe Jodangebot in der Nahrung durch eine präferentielle T_3 -Sekretion ökonomisch zu nutzen und mit Hilfe dieser kompensatorischen Mehrsekretion von T_3 trotz Jodmangel eine Euthyreose aufrecht zu erhalten.

Wir untersuchten bei 25 Patienten mit blander Struma die Relation des T_3 - zu T_4 -Spiegels und die TSH-Spiegel einschließlich TRH-Belastungstest mit der Frage nach der adäquaten T_3 -Mehrsekretion, die eine normale Schilddrüsenfunktion aufrecht erhalten kann und versuchten weiter zu klären, ob diese kompensatorische T_3 -Mehrsekretion durch exogene Jodsubstitution beeinflussbar ist.

3.2.7.1. Serumspiegel von T_3 und T_4 bei blander Struma

In Übereinstimmung mit dem klinischen Aspekt einer normalen Schilddrüsenfunktion waren bei allen 25 untersuchten Patienten mit blander Struma die basalen TSH-Spiegel normal: $bTSH = 1,6 \pm 1,2 \mu E/ml$ ($\bar{x} \pm s$). Beim TRH-Belastungstest war die TSH-Antwort auf TRH bei 22 Patienten als Zeichen einer Euthyreose normal, bei 3 Patienten allerdings erhöht. Die T_4 -Spiegel dieser 25 Patienten lagen dabei im Mittel mit $6,1 \pm 1,6 \mu g/100 ml$ ($\bar{x} \pm s$) signifikant unter denen des Normalkollektivs mit $6,5 - 1,4 g/100 ml$ ($p < 0,001$). Mit $1,8 \pm 0,5$ ($\bar{x} \pm s$) lag auch der Index des freien Thyroxin deutlich unter dem des von uns untersuchten Normalkollektivs von $2,4 \pm 0,6$ ($\bar{x} \pm s$). Als Ausdruck einer kompensatorischen Mehrsekretion von T_3 lagen die T_3 -Spiegel mit $140,0 \pm 27 pg/100 \mu l$ ($\bar{x} \pm s$) signifikant ($p < 0,005$) höher als bei den schilddrüsengesunden Kontrollpersonen ($113 \pm$

17). Entsprechend berechneten sich für diese Strumapatienten T_3/T_4 -Quotienten, die mit $24,4 \pm 8,3 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) im Mittel deutlich über dem des Normalkollektivs mit $17,9 \pm 4,0 \times 10^{-3}$ ($\bar{x} \pm s$) lagen. Die T_3 - und T_4 -Spiegel, bzw. T_3/T_4 -Quotienten bei den 3 Patienten mit erhöhtem TSH-Anstieg beim TRH-Belastungstest waren gegenüber den restlichen 22 Patienten mit normalem Anstieg des TSH nicht auffällig verändert (Abb. 14).

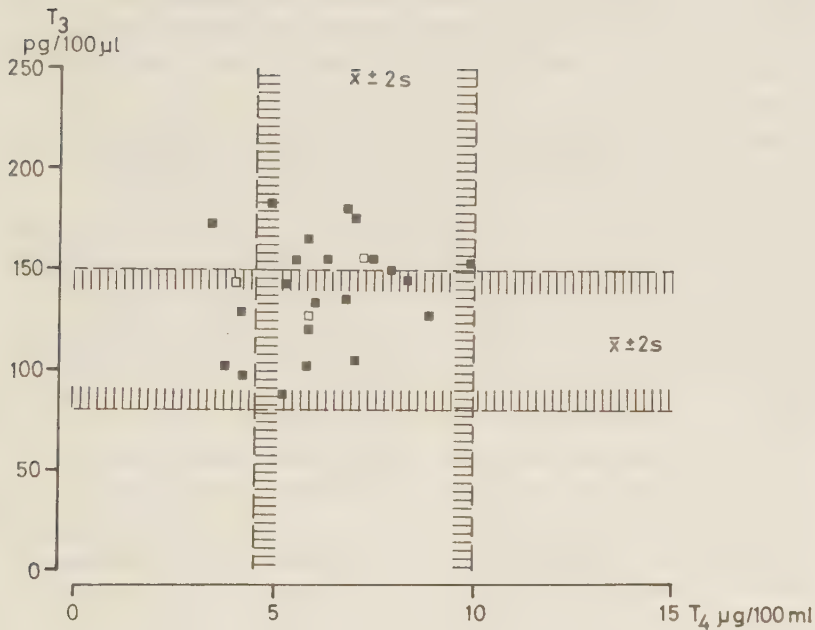


Abbildung 14: Serumspiegel von T_3 und T_4 bei blander Struma

Es sind die Hormonspiegel von 25 Patienten mit blander Struma aufgezeichnet. Der Anstieg von TSH im TRH-Stimulationstest war bei 22 Patienten normal (■), bei den übrigen 3 Patienten erhöht (□). Die Normalbereiche für T_3 und T_4 sind durch die schraffierten Linien gekennzeichnet.

3.2.7.2. Kaliumjodidsubstitution bei Patienten mit blander Struma

Als eine Ursache für die Entstehung einer blanden Struma ist seit langem das unzureichende Jodangebot mit der Nahrung in Endemiegebieten bekannt (77,84,94,96). Eine konsequente Folgerung aus dieser Erkenntnis war die Jodsalzprophylaxe in Endemiegebieten, z.B. in der Schweiz und in Österreich. Obwohl die Bundesrepublik Deutschland nachgewiesenermaßen ebenfalls ein endemisches Jodmangelgebiet ist (38) wurde hier eine Jodprophylaxe, die jetzt von der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie gefordert wurde (97), noch nicht eingeführt. Wir untersuchten bei 4 Patienten mit blander Struma den Einfluß einer Jodsubstitution auf die Schilddrüsenhormon- und TSH-Spiegel. Dazu wurden den Patienten über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich 200 µg Jodid (Jodidtabletten Merck^R) oral verabreicht.

	T ₃ pg/100 µl		T ₄ µg/100 ml		T ₃ /T ₄ -Quotient		TSH µE/ml	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
	Jodidgabe		Jodidgabe		Jodidgabe		Jodidgabe	
S.I.	183,6	148,5	4,9	4,8	37,5	30,9	1,2	1,4
A.L.	179,7	164,0	6,8	8,1	26,4	20,2	2,2	1,9
S.C.	155,7	128,1	7,4	11,4	21,0	11,2	0,8	1,0
B.R.	165,6	144,3	5,8	6,8	28,6	21,2	3,4	3,2
$\bar{x}$	171,2	146,2	6,2	7,8	28,4	20,9	1,9	1,9
s	12,4	14,8	1,1	2,8	6,9	8,0	1,2	1,0

Tabelle 5: Einfluß einer oralen Kaliumjodidgabe auf die Schilddrüsenhormonspiegel bei 4 Patienten mit blander Struma

Die Serumspegel von T₃ und T₄ wurden vor und nach 4 Wochen unter Kaliumjodidbehandlung (200 µg tgl.) gemessen und die T₃/T₄-Quotienten berechnet. Zusätzlich sind die basalen TSH-Spiegel angegeben.

Wie in Tab. 5 verdeutlicht, fielen die T_3 -Spiegel und die T_3/T_4 -Quotienten unter der Jodidzufuhr im Mittel deutlich ab, waren jedoch im Vergleich zu Normalpersonen immer noch erhöht. Wenngleich die untersuchte Fallzahl von 4 Patienten zu gering und der beobachtete Behandlungszeitraum von 4 Wochen zu kurz waren, zeichnet sich jedoch die Möglichkeit einer Normalisierung der Schilddrüsenfunktion durch Jodsubstitution ab.

3.2.8. Antwort der Schilddrüsenhormonspiegel auf einen Anstieg der TSH-Spiegel nach TRH-Gabe

Exogen zugeführtes TRH vermag beim Gesunden die endogene TSH-Sekretion zu stimulieren, die wiederum in der Schilddrüse eine Steigerung der Schilddrüsenhormonsynthese und -sekretion zur Folge hat (2.3.1.5.). Unsere Untersuchungen sollten die zeitliche Latenz zwischen dem TRH-bedingten TSH-Anstieg und dem durch diesen TSH-Anstieg induzierten Schilddrüsenhormonanstieg näher erklären. Weiter interessierte die Frage, ob durch TSH ein paralleler Anstieg von T_4 und T_3 im Serum erfolgt oder etwa eine präferentielle T_3 -Mehrsekretion und zum anderen, welche Rückwirkung die Erhöhung der Schilddrüsenhormonspiegel auf die TSH-Spiegel zeigt. Alle vier von uns untersuchten Patienten waren klinisch und nach der konventionellen Schilddrüsendiagnostik euthyreot (Abb. 15). Während dem Patient G.R. eine einmalige Gabe von 200 μg TRH i.v. als Bolus appliziert wurde, erhielten die drei anderen Patienten nach einer Startinjektion von 200 μg TRH weitere 800 μg TRH über einen Zeitraum von 240 Minuten. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Hollander (49) zeigte der Patient G.R. bei einer einmaligen TRH-Gabe einen unmittelbaren Anstieg von TSH mit einem Gipfel in der 20. bis 30. Minute von 4,4 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Mit einer Latenz von 30 Minuten erfolgte der Anstieg des T_3 -Spiegels um 28 $\text{pg}/100 \mu\text{l}$. Der T_4 -Spiegel stieg parallel um 1,9 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ an. Der Gipfel dieser Anstiege wurde nach 115 Minuten erreicht, zu einem Zeitpunkt also, bei dem der TSH-Spiegel schon wieder auf die Hälfte seines Ausgangswertes abgefallen war.

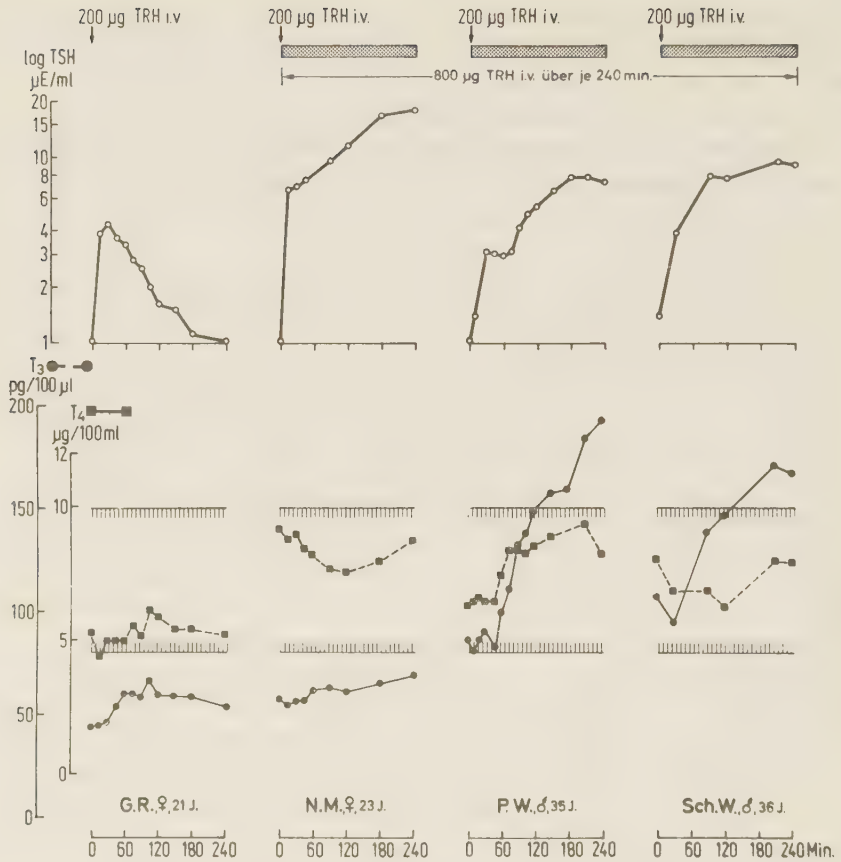


Abbildung 15: Änderungen der Schilddrüsenhormonspiegel von T₃

und T₄, sowie der TSH-Spiegel bei exogener Zufuhr von TRH

Bei Patient G.R. erfolgte eine einmalige Bolusinjektion von 200 µg TRH i.v.. Bei den übrigen 3 Patienten folgte der gleichen Initialdosis von 200 µg TRH eine Langzeitinfusion von 800 µg TRH über einen Zeitraum von 240 Minuten. Im oberen Teil der Abbildung sind die TSH-Spiegel aufgetragen, im unteren Teil die zugehörigen T₃- und T₄-Spiegel. Der Normalbereich für die Schilddrüsenhormone ist durch die schraffierten Linien (obere und untere Grenze der Normalbereiche) gekennzeichnet.

Die Schilddrüsenhormonspiegel fielen nach der 115. Minute wieder ab. Der T_4 -Ausgangswert wurde nach 240 Minuten erreicht, während der T_3 -Spiegel noch gering erhöht war. Die Patienten P.W. und Sch.W. zeigten nach einer Startinjektion von 200 μ g TRH und darauf folgender Infusion von 800 μ g TRH über 4 Stunden einen kontinuierlichen TSH-Anstieg bis zur 180. Minute. Danach blieben die TSH-Spiegel trotz weiter bestehender Stimulierung durch TRH gleich oder fielen sogar geringfügig wieder ab. Dieses Verhalten der TSH-Spiegel wurde auch schon von Snyder (99) unter ähnlichen Versuchsbedingungen beobachtet, der einen Abfall der TSH-Spiegel auf eine Erhöhung der peripheren Schilddrüsenhormonspiegel zurückführte. Bei unserem Patienten P.W. stiegen die Hormonspiegel von T_3 und T_4 nach 40 Minuten anfänglich simultan an, doch zeigte sich nach der 90. Minute für T_3 ein steilerer Anstieg als für T_4 . Auch der Patient Sch.W. reagierte auf die vermehrte Stimulation durch TSH mit einem signifikanten T_3 -Anstieg bei anfänglich nicht zu erklärenden absinkenden T_4 -Spiegeln. Die Patientin N.M. mit Anorexia nervosa zeigte schon bei anfänglich auffälligerweise erniedrigtem T_3 -Spiegel keine derart ausgeprägte T_3 -Antwort bei gut stimulierbaren TSH-Spiegeln.

3.2.9. TSH-Suppression und periphere Schilddrüsenhormonspiegel nach Schilddrüsenhormonsubstitution bei hypothyreoten Patienten

Die Schilddrüsenhormonsynthese und -ausschüttung aus der Schilddrüse wird bekanntlich über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch das in der Hypophyse gebildete Thyreidea stimulierende Hormon (TSH) reguliert. Bei der primären Hypothyreose führt dabei eine primär in der Schilddrüse begründete Unfähigkeit, genügend Schilddrüsenhormon bereitzustellen, zu einer über die Norm gesteigerten TSH-Ausschüttung aus der Hypophyse (vgl. 3.2.2.). Die Substitution mit Schilddrüsenhormonen gleicht einen solchen Mangel aus. Als Maß für eine ausreichende Substitution dienen neben der Normalisierung der Schilddrüsenhormonspiegel im Blut die in den Normalbereich absinkenden supprimierten

TSH-Spiegel (26).

Bei den folgenden Untersuchungen an primär hypothyreoten Patienten beobachteten wir den Verlauf der TSH-Spiegel sowie die Spiegel von T_3 und T_4 bei einmaliger und langzeitiger Gabe von T_3 bzw. T_4 . Wir versuchten dabei eine Antwort auf die Frage zu erhalten, mit welcher Latenz die TSH-Spiegel auf Schilddrüsenhormongabe abfallen und ob sich eine Korrelation zwischen TSH Suppression und Serumspiegeln feststellen läßt. Da heute von manchen Autoren die Ansicht vertreten wird, daß das Trijodthyronin das entscheidende und möglicherweise peripher alleine wirksame Schilddrüsenhormon ist, und T_4 dabei im Sinne eines Prohormons erst durch Dejodierung zu T_3 biologisch aktiv werden kann (7,17,18,102,107), galt unser besonderes Interesse dem zeitlichen Ablauf des T_3 -Anstieges nach T_4 -Monotherapie und der Frage, ob die TSH-Suppression bei Gabe von T_4 eine direkte Reaktion auf T_4 ist oder ob T_4 erst durch Konversion zu T_3 suppressiv wirksam ist.

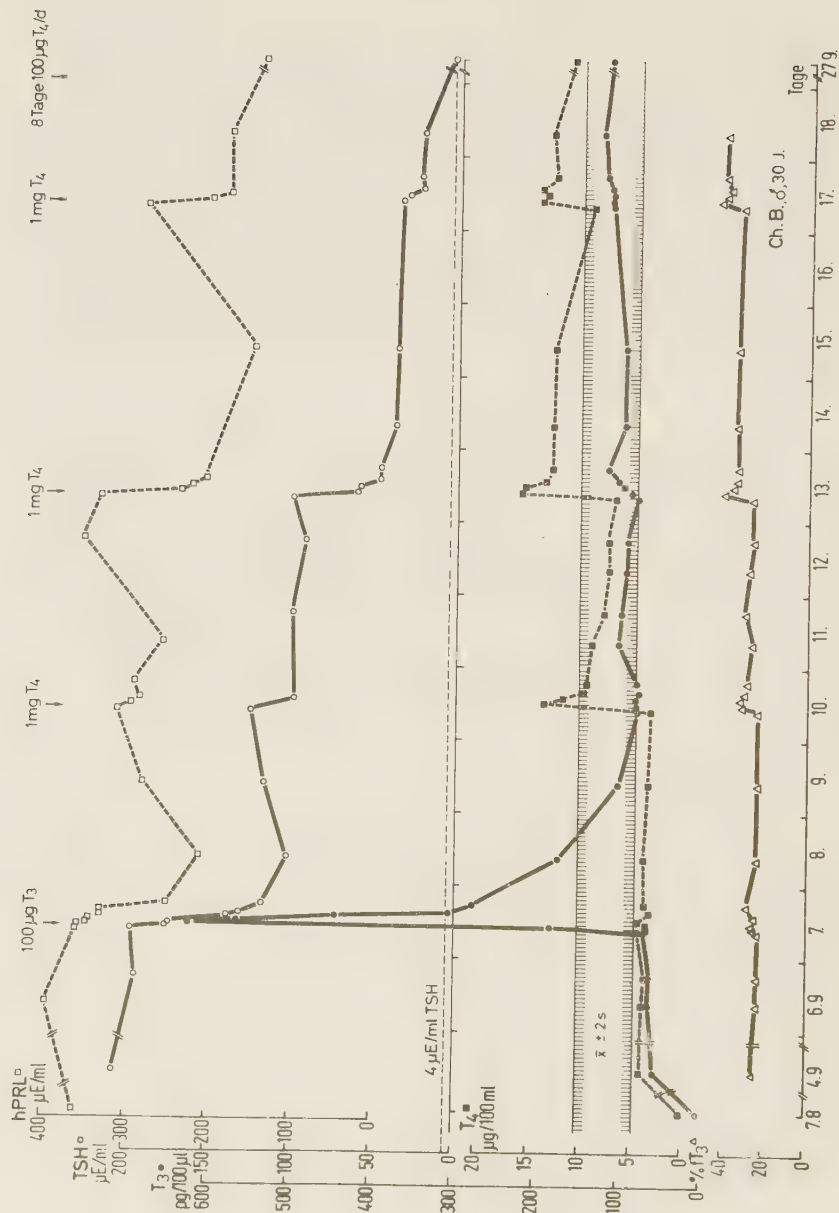
3.2.9.1. Serumspiegel von T_3 , T_4 und TSH bei einmaliger Gabe von T_3 bzw. T_4

Zwei primär hypothyreote Patienten erhielten T_3 -Einzeldosen an verschiedenen Tagen und später auch T_4 -Einzeldosen. Der Patient Ch.B. (Abb. 16) erhielt eine einmalige orale Gabe von 100 μg T_3 und am 4., 7. und 11. Tag jeweils 1 mg T_4 oral. Der T_3 -Wert vor der T_3 -Gabe lag bei 72 pg/100 μl und stieg in der 2. Stunde auf einen Wert von 621 pg/100 μl an, um sich dann innerhalb der folgenden 24 Stunden wieder im Normalbereich für T_3 zu befinden und nach 3 Tagen wieder den Ausgangswert zu erreichen. Der zu Beginn erhöhte TSH-Spiegel von 197 $\mu\text{E}/\text{ml}$ fiel unmittelbar auf die T_3 -Gabe rasch ab, um nach 24 Stunden den tiefsten Wert von 102 $\mu\text{E}/\text{ml}$ zu erreichen. Mit Absinken der T_3 -Spiegel in den unteren Normbereich am 2. und 3. Tag war dann wieder ein Ansteigen des TSH zu verzeichnen. Die T_4 -Spiegel zeigten keine wesentliche Änderung.

Ein ähnliches Verhalten zeigen die T_3 -, T_4 - und TSH-Spiegel bei der Patientin L.R. (Abb. 17). Der T_3 -Ausgangswert von 19 pg/100 μ l stieg auch hier auf orale Gabe von 100 μ g T_3 nach 2 Stunden auf einen weit im hyperthyreoten Bereich liegenden Wert von 643 pg/100 μ l an, um dann innerhalb der folgenden 12 Stunden an der oberen Grenze des Normbereichs zu liegen und nach insgesamt 3 Tagen wieder auf den Ausgangsspiegel abzusinken. Ebenso ist ein Abfall der TSH-Spiegel von 57 μ E/ml auf 23 μ E/ml nach 24 Stunden zu verzeichnen und der sich daran anschließende Anstieg auf den Ausgangswert im Laufe der folgenden Tage. Der T_4 -Wert blieb von der T_3 -Gabe unbeeinflusst.

Ein ähnlicher TSH-supprimierender Effekt konnte auch nach einmaligen oralen Gaben von jeweils 1 mg T_4 bei dem Patienten Ch.B. (Abb. 16) am 4., 7. und 11. Tag und von 2 mg T_4 bei der Patientin L.R. (Abb. 17) am 6. Tag nachgewiesen werden. Die T_4 -Spiegel stiegen jedesmal deutlich über die obere Grenze des Normalbereiches an, um dann auch Tage danach noch im Normalbereich zu liegen. Wie an dem Verlauf der T_3 -Spiegel nach T_4 -Gabe abzulesen ist, kommt es in jedem Fall zu einem verzögerten Anstieg der T_3 -Spiegel, was nicht durch eine Verunreinigung der T_4 -Medikation erklärbar ist, sondern als Konversion des verabreichten T_4 zu T_3 erklärt werden mußte.

Bemerkenswert war bei der oralen T_4 -Gabe weiter, daß trotz normalisierter, zum Teil sogar erhöhter T_4 -Spiegel und normaler T_3 -Spiegel über viele Tage die TSH-Spiegel eine nur sehr langsame Tendenz zeigten, in den Normalbereich abzusinken.



Ch. B. d. 30 J.

Abb. 16: Serumspiegel von T_3 , T_4 , TSH und hPRL bei einem Patienten mit primärer Hypothyreose nach einmaliger Gabe von 100 μg T_3 und weiteren Gaben von 1 mg T_4 an den bezeichneten Tagen.
Zusätzlich wurden die $T_3\text{U}$ -Meßwerte eingetragen.

Aufgetragen sind die Hormonspiegel von T_3 (●), T_4 (■), TSH (○), hPRL (□) und die Ergebnisse des T_3 -in vitro-Testes (Δ) über die Dauer des Beobachtungszeitraumes in Tagen. Zwischen dem 7.8. und 7.9. wurde der Patient bereits mit Schilddrüsenhormonen behandelt. Am 7.9. erhielt er 100 μg T_3 oral, am 10.9., 13.9. und 17.9. jeweils Einzeldosen von 1 mg T_4 oral. Ab dem 19.9. erfolgte die weitere Einstellung des Patienten mit 100 μg T_4 oral. Der Normalbereich für T_3 und T_4 ist durch die gestrichelten Querbalken (obere und untere Grenze des Normalbereiches) gekennzeichnet. Der Normalbereich für TSH liegt unter der gestrichelten Linie bei 4 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

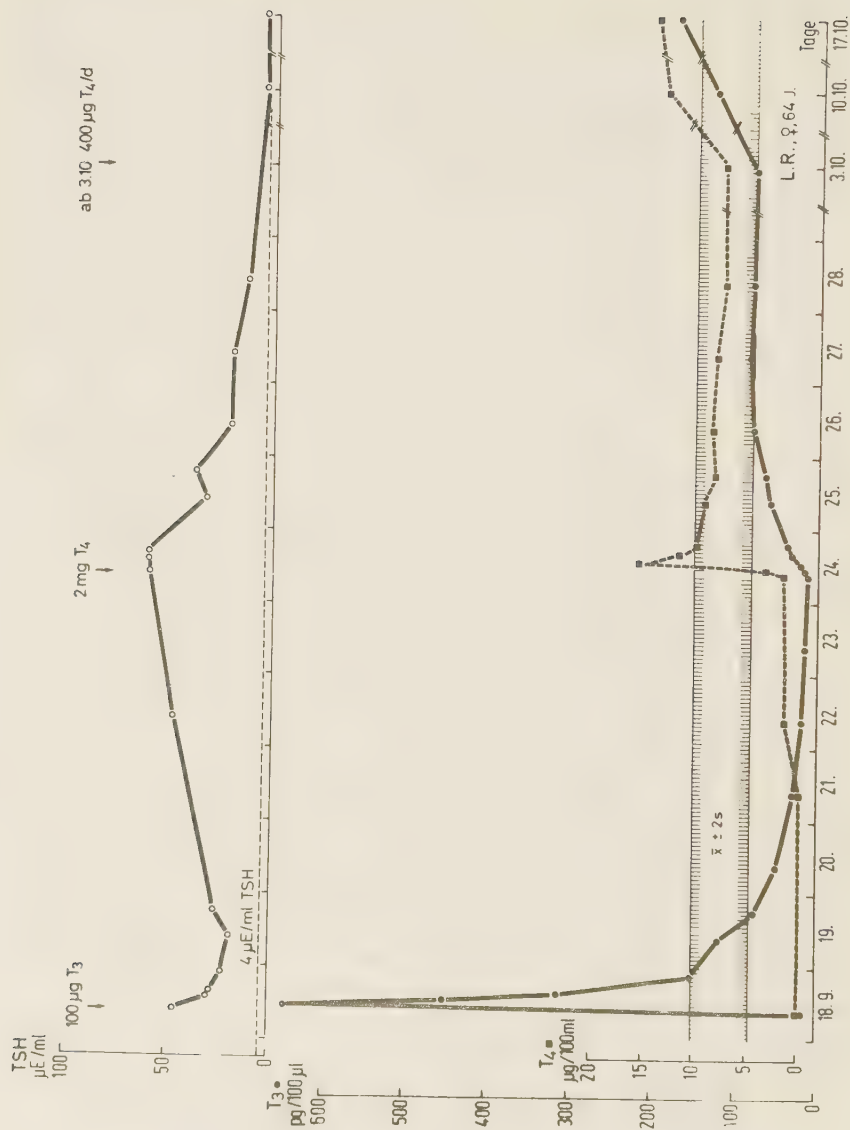


Abbildung 17: Serumspiegel von T_3 , T_4 und TSH bei Hormonsubstitution einer primär hypothyreoten Patientin mit einmaligen Dosen von T_3 bzw. T_4

Aufgetragen sind die Hormonspiegel von T_3 (●), T_4 (■) und TSH (○) über die Dauer des Beobachtungszeitraumes in Tagen. Die athyreote Patientin erhielt am 18.9. 100 µg T_3 oral und am 24.9. eine Einzeldosis von oral 2 mg T_4 . Ab dem 3.10. wurde die Patientin täglich mit 400 µg T_4 über 14 Tage weiterbehandelt.

Der Normalbereich für T_3 und T_4 ist durch die gestrichelten Balken (obere und untere Grenze des Normalbereiches) gekennzeichnet. Der Normalbereich für TSH liegt unterhalb der gestrichelten Linien bei 4 µE/ml TSH.

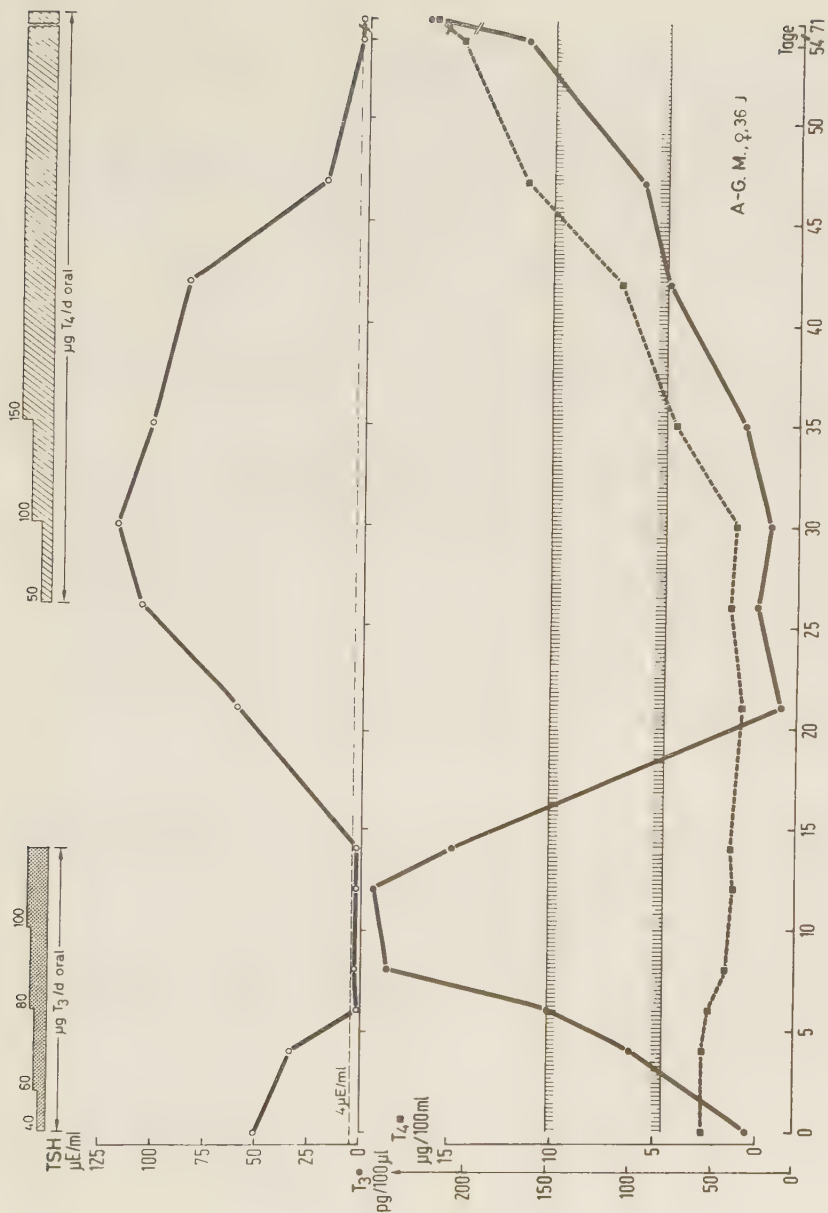
3.2.9.2. Veränderungen der TSH-Spiegel, sowie der T_4 - und T_3 -
Spiegel bei Patienten mit primärer Hypothyreose unter
Langzeitbehandlung mit T_4 bzw. T_3

Zwei primär hypothyreote Patienten A-G.M. (Abb. 18) und H.M. (Abb. 19) wurden mit steigenden Mengen T_3 (Thybon^R) für 12 bzw. 22 Tage substituiert und nach einer Behandlungspause von 2 Tagen mit T_4 (T_4 - Henning^R) in steigenden Dosen.

Die Patientin A-G.M. zeigte unter der T_3 -Therapie einen Anstieg der T_3 -Spiegel von 27 pg/100 μ l auf maximal 254 pg/100 μ l am 12. Behandlungstag. Nach Absetzen der Medikation fiel der T_3 -Spiegel wieder auf einen Wert von 11 pg/100 μ l ab. Als Zeichen einer ausreichenden Hormonzufuhr befanden sich ab dem 5. Behandlungstag die TSH-Spiegel im Normalbereich. Erst nach Absetzen der T_3 -Medikation ab dem 12. Tag stiegen die TSH-Spiegel wieder auf hohe Werte an.

Abbildung 18: Serumspiegel von T_3 , T_4 und TSH bei Langzeitthe-
rapie einer hypothyreoten Patientin mit T_3
bzw. T_4

Aufgetragen sind die Hormonspiegel von T_3 (●), T_4 (■) und TSH (○) über die Dauer des Beobachtungszeitraumes in Tagen. Die jeweiligen Dosierungen sind über den Behandlungstagen aufgetragen. Der Normalbereich für T_3 und T_4 ist durch die gestrichelten Balken (obere und untere Grenze des Normalbereiches) gekennzeichnet. Der Normalbereich für TSH liegt unter der gestrichelten Linie bei 4 μ E/ml.



Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Patientin H.M. (Abb. 19) unter ebenfalls einschleichender Behandlung mit T_3 beobachtet werden. Auch hier gelang es, mit ausschließlich T_3 -Gabe die TSH-Spiegel zu supprimieren, wenngleich sich die T_3 -Spiegel nicht in dem Maße in hyperthyreoten Bereichen bewegten wie bei der Patientin A-G.M. (Abb. 18). Nach Absetzen der T_3 -Medikation kehrten bei beiden Patienten die T_3 -Spiegel erwartungsgemäß innerhalb von 48 Stunden wieder auf hypothyreote Werte zurück.

Ähnlich wie bei der Substitution mit T_3 führte eine neuerliche Substitution der beiden Patienten mit nun täglich verabreichten T_4 -Dosen zu einem erwarteten Anstieg der T_4 -Spiegel im Serum der Patienten. Die T_4 -Spiegel erreichten bald Normalwerte, wobei bei der Patientin A-G.M. die hohe Dosierung von 150 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ schon bald zu hyperthyreoten T_4 -Werten führten. Wie die Abbildungen verdeutlichen, war sowohl durch die Gabe von T_3 , wie auch von T_4 eine Suppression der anfangs erhöhten TSH-Spiegel zu erreichen. Im Gegensatz zu der T_3 -Gabe erfolgte jedoch bei beiden Patienten der TSH-Abfall nicht unmittelbar nach den ersten Tagen mit T_4 -Medikation, vielmehr stiegen die TSH-Spiegel sogar noch unter der T_4 -Gabe von 50 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ an, um dann am 5. Tag etwa wieder abzufallen.

Da lediglich bei der Patientin A-G.M. auch unter der Behandlung mit T_4 die T_3 -Spiegel gemessen wurden, bei der Patientin H.M. reichten die Serumproben zur T_3 -Bestimmung nicht aus, ließ sich für diese Patientin auch hier eine Konversion von T_4 zu T_3 nachweisen. Eine T_3 -Verunreinigung des T_4 -Präparates ist ausgeschlossen, da direkte T_3 -Gabe unmittelbar einen T_3 -Anstieg zur Folge gehabt hätte.

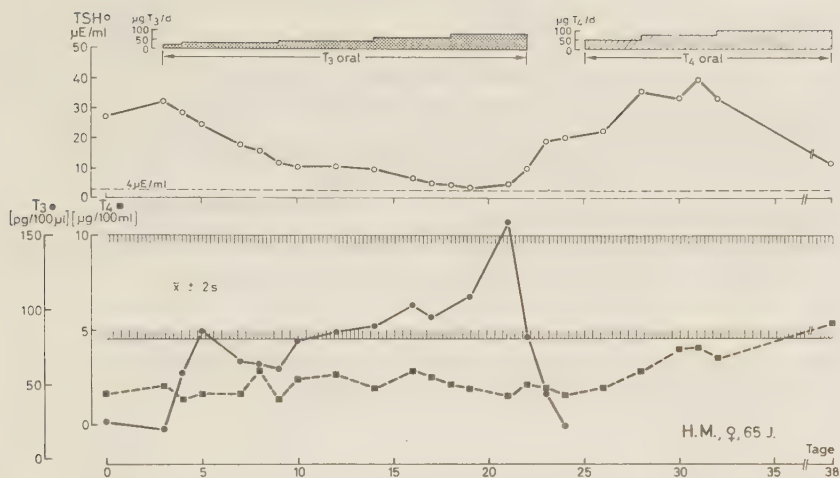


Abbildung 19: Serumspegel von T₃, T₄ und TSH bei Langzeittherapie einer hypothyreoten Patientin mit T₃ bzw.

T₄

Aufgetragen sind die Hormonspiegel von T₃ (●), T₄ (■) und TSH (○) über die Dauer des Beobachtungszeitraumes in Tagen. Die jeweiligen Dosierungen sind über den Behandlungstagen aufgetragen. Der Normalbereich für T₃ und T₄ ist durch die gestrichelten Balken (obere und untere Grenze des Normalbereiches) gekennzeichnet. Der Normalbereich für TSH liegt unter der gestrichelten Linie bei 4 µE/ml.

3.2.9.3. Schilddrüsenhormonspiegel nach langzeitiger T_4 - Substitution bei sekundärer Hypothyreose

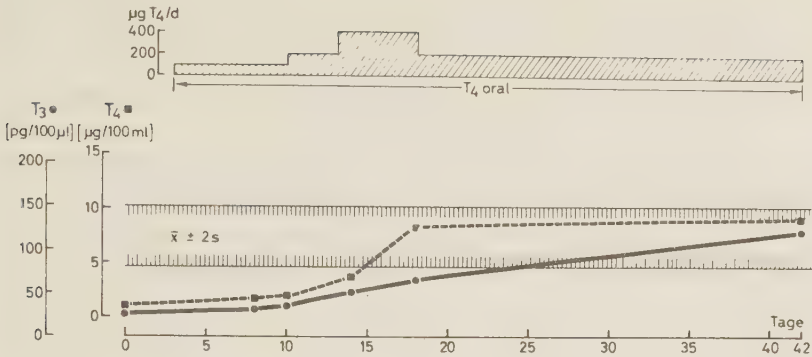
Zwei Patienten mit einer sekundären Hypothyreose nach Operation eines Hypophysenvorderlappentumors wurden mit T_4 substituiert und die T_3 - und T_4 -Spiegel dieser Patienten gemessen. Die T_4 -Spiegel stiegen mit einer Substitutionsdosis von 150 bzw. 400 $\mu\text{g } T_4$ in den Normalbereich an. Der Anstieg der T_3 -Spiegel im Blut erfolgte wenig verzögert und erreichte bei T.J. nach etwa 24-tägiger Behandlung mit 200 $\mu\text{g } T_4$ den Normalbereich, während die Behandlung mit 150 $\mu\text{g } T_4$ bei P.M. über 10 Tage noch nicht zu einer Normalisierung der T_3 -Spiegel ausreichte (Abb. 20).

3.2.10. Prolaktinspiegel bei einem Patienten mit primärer Hypothyreose nach exogener Substitution mit T_3 , bzw. T_4

Die Tatsache, daß bei hypothyreoten Patienten die Prolaktinspiegel im Mittel signifikant höher liegen als bei hyperthyreoten Patienten und zum anderen im TRH-Belastungstest nicht nur TSH sondern auch der Prolaktinspiegel deutlich ansteigt (100, 111), veranlaßte uns, bei einem primär hypothyreoten Patienten unter oraler Substitutionstherapie mit T_3 und T_4 neben dem TSH auch die Prolaktinspiegel im Serum zu bestimmen. Das Ergebnis dieser Meßreihe ist in der Abbildung 16, S.60, abzulesen.

Der Patient Ch.B. erhielt eine einmalige orale Dosis von 100 $\mu\text{g } T_3$ und danach am 4., 7. und 11. Tag jeweils 1 mg T_4 oral verabreicht. Die Parallelität von TSH- und Prolaktin-Verlauf ist offensichtlich, wenngleich nicht sicher ist, ob diese Mitreaktion von Prolaktin unspezifisch ist oder ob ihr eine physiologische Bedeutung zukommt.

T. J., ♂, 54 Jhr



P. M., ♀, 48 Jhr.

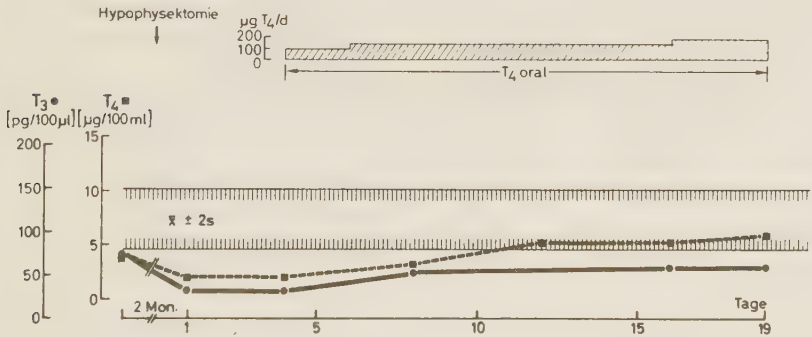


Abbildung 20: Serumspegel von T_3 und T_4 bei Langzeittherapie
zweier sekundär hypothyreoter Patienten mit T_4

Aufgetragen sind die Hormonspegel von T_3 (●) und T_4 (■) über die Dauer des Beobachtungszeitraumes in Tagen. Die verordneten T_4 -Dosen sind über den Behandlungstagen angegeben. Der Normalbereich für T_3 und T_4 ist durch die gestrichelten Balken (obere und untere Grenze des Normalbereiches) gekennzeichnet.

4. METHODISCHE VORVERSUCHE

4.1. T_3 -Radioimmunoassay im unextrahierten Serum bei Einsatz sog. TBG-blockender Substanzen

Wie im Abschnitt über die speziellen Probleme des T_3 -RIA beschrieben (siehe 2.3.3.2.), dürfen zur radioimmunologischen Bestimmung des T_3 neben dem spezifischen T_3 -Antikörper keine weiteren Proteine im Ansatz vorhanden sein, die mit der Bindung zwischen T_3 und dem T_3 -Antikörper interferieren. Neben der Extraktion des T_3 aus dem Serum wurde in den letzten Jahren von vielen Autoren der Einsatz sog. TBG-blockender Substanzen propagiert, die direkt in den Inkubationsansatz von Serum und T_3 -Antiserum gegeben werden und dort eine Freisetzung des T_3 vom TBG und eine Blockierung der Bindungsstellen des TBG bewirken sollen. Hierzu wurden zunächst Diphenylhydantoin (66), Tetrachlorthyronin (70), T_4 im Überschuß (14,34) und Salicylate (19,42) eingesetzt. Heute werden im wesentlichen 8-Anilino-1-naphthalen-Sulfonsäure (ANS) (15,45,69,71,90) und Merthiolat (29,41,42,108) verwendet. Wegen der Einfachheit dieser direkten Messung des T_3 im unextrahierten Serum haben wir vor der Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens ebenfalls diese Möglichkeit in Betracht gezogen und diese Methoden auf Störfaktoren hin untersucht.

4.1.1. Verdrängung des T_3 vom TBG

Zunächst mußte geprüft werden, welche Menge an TBG-blockender Substanz zur quantitativen Freisetzung des T_3 vom TBG notwendig war. Dazu wurden 100 μ l zweier T_3 - und T_4 -freier Seren unterschiedlichen TBG-Gehaltes (2.1.7.) mit steigenden Mengen 8-Anilino-1-naphthalen-Sulfonsäure (ANS) versetzt und mit T_3 -Tracer über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Bound/Free-Trennung erfolgte dann säulenchromatographisch nach dem Prinzip des T_3 -in vitro-Testes über Sephadex G - 25 superfine-Säulen (2.3.3.3.2.4.).

Die Bindungsraten des bei verschiedenen ANS-Konzentrationen an TBG gebundenen T_3 wurden in Prozent der Bindungsrate von T_3 an das TBG-reiche Nullserum ohne Zugabe von ANS (B_0) berechnet (Abbildung 21, Kurve 1 und 2).

Wie der Verlauf der Kurve 1 zeigt, fiel die Bindung des T_3 an TBG von 78 % (ohne ANS) bei Einsatz von 50 bis 100 μg ANS auf gleichbleibend 12 % ab. Dahingegen wurde bei dem Nullserum mit höherem TBG-Gehalt (II) selbst bei Einsatz von 400 μg ANS keine gleichwertige Freisetzung des T_3 aus der TBG-Bindung erreicht. Daraus folgte, daß zur quantitativen Freisetzung von T_3 aus dem Serum mit unterschiedlichen TBG-Gehalten unterschiedliche Konzentrationen an TBG-blockenden Substanzen benötigt werden. Daneben war eine vollständige Blockierung der TBG-Bindung selbst bei Einsatz von hohen ANS-Konzentrationen nicht möglich. Bei Einsatz von Merthiolat (0-4 mg/Ansatz) und Natriumsalicylat 0-20 mg/Ansatz) lagen die Ergebnisse der Verdrängung des T_3 quantitativ in derselben Größenordnung.

4.1.2. Interferenz von TBG-blockenden Substanzen mit dem T_3 -Antikörper

Anstelle des im vorigen Abschnitt (4.1.1.) verwendeten Nullserums wurde die T_3 -Antikörperlösung mit T_3 -Tracer und steigenden Mengen ANS in 0,05 M Barbitalpuffer, pH 8,9, über Nacht inkubiert und dann eine Bound/Free-Trennung wieder über Sephadex G - 25 s.f. - Säulen durchgeführt.

Wie die Kurve 3 der Abbildung 21 zeigt, verdrängte ANS mit steigender Konzentration zunehmend T_3 aus seiner Bindung an den T_3 -Antikörper. Die Bindung des T_3 an den spezifischen T_3 -Antikörper wurde auch durch die anderen TBG-blockenden Substanzen (Merthiolat und Natriumsalicylat) in ähnlicher Weise gestört.

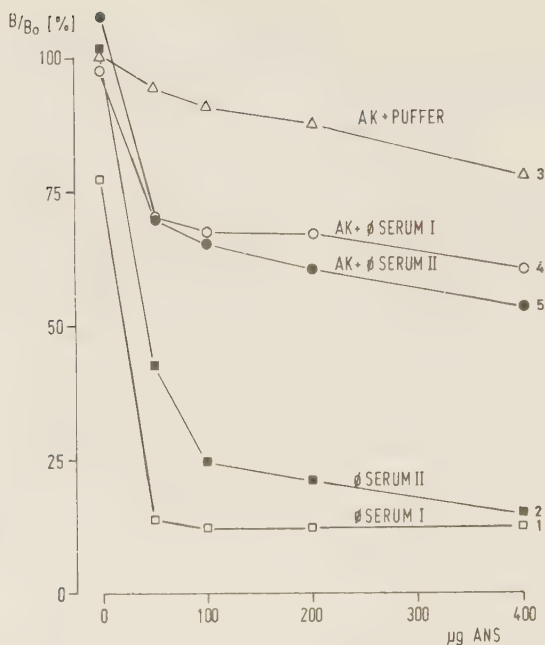


Abbildung 21: Einfluß von ANS auf die Bindung von T_3 an den T_3 -Antikörper und die spezifisch bindenden Serumproteine

Aufgezeichnet ist die ANS-konzentrationsabhängige Verdrängung des T_3 von Seren mit unterschiedlichen TBG-Gehalten (Kurve 1 und 2), von dem T_3 -Antikörper in Pufferlösung (Kurve 3) und von dem T_3 -Antikörper bei Inkubation mit zwei Seren unterschiedlichen TBG-Gehaltes. (Serum I = TBG normal, Serum II = TBG-reich). Die jeweiligen Bindungsraten sind prozentual zu der Bindungsrate des T_3 an das TBG-reichere Serum ohne Zugabe von ANS (B_0) berechnet.

4.1.3. Einfluß von ANS auf die Bindung des T_3 an den T_3 -Antikörper im unextrahierten Serum

Wie zuvor gezeigt (4.1.1. und 4.1.2.), verdrängt ANS das T_3 nicht nur von den spezifisch bindenden Serumproteinen (vorwiegend TBG), sondern auch aus der Bindung an den T_3 -Antikörper. Bei Inkubation von T_3 -Tracer und T_3 -Antikörper mit den beiden T_3 -freien Seren mit unterschiedlichem TBG-Gehalt fielen entsprechend mit steigenden ANS-Konzentrationen die Bound-Raten ab. Eine Übereinstimmung dieser Raten in den beiden Null-Seren konnte jedoch nicht erreicht werden (siehe Abbildung 21, Kurve 4 und 5). Aus diesen Ergebnissen mußte geschlossen werden, daß die exakte Messung von T_3 im unextrahierten Serum nicht möglich ist.

4.2. Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum auf Kationenaustauschersäulen mit anschließender radioimmunologischer Bestimmung des T_3

Methoden zur Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum sind bekannt (6,37,88,89). Allerdings war der technische und apparative Aufbau der von diesen Autoren beschriebenen und heute wieder verlassenen Methoden der Extraktion auf Kationenaustauschersäulen sehr aufwendig, da aufgrund der unempfindlichen chemischen Nachweisverfahren von T_3 und T_4 durch kompetitive Proteinbindungsanalysen sehr große Serummengen von 2,5 bis 3 ml eingesetzt werden mußten. Da der hochempfindliche Radioimmunoassay exakte Messungen auch noch in 100 μ l Serum erlaubt, überprüften wir die Möglichkeit, die von den oben erwähnten Autoren beschriebenen Säulenchromatographiemethoden mit Kationenaustauschergelen auf ein Mikrosäulensystem bei Einsatz von nur 100 μ l Serum übertragbar zu machen.

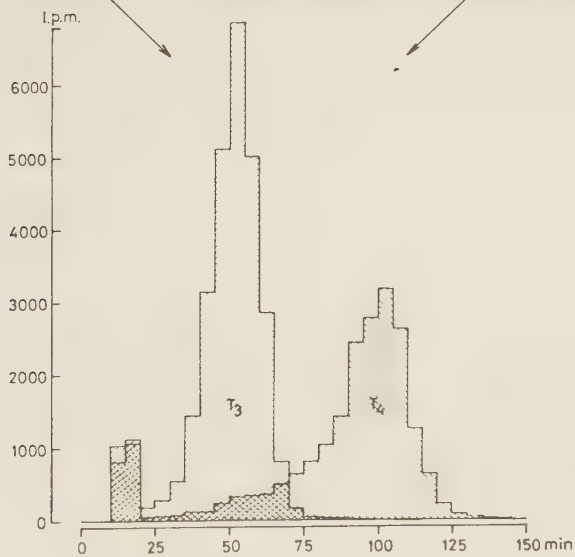
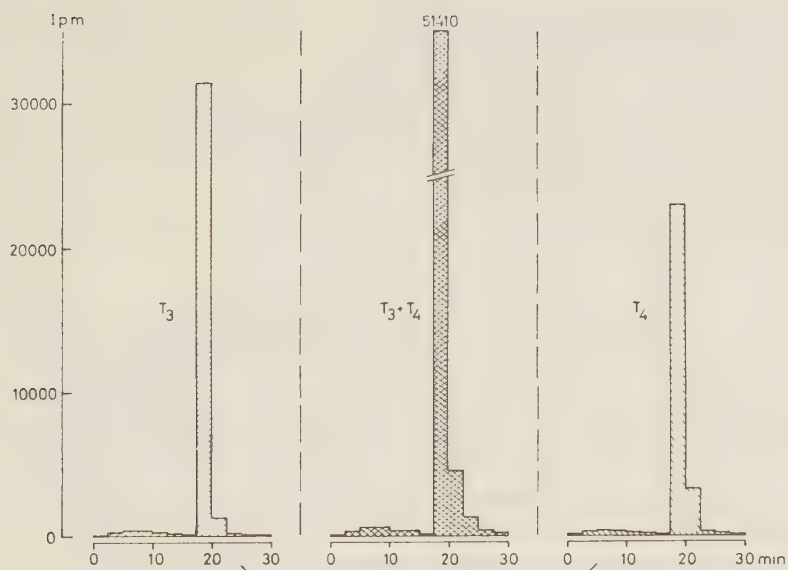
Die Abtrennung der Thyronine von den Serumproteinen geschah dabei in drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 wurden auf angesäuerten Austausch-Säulen an das Gel gebunden, während die Schilddrüsenhormonbindenden Proteine und anorganisches Jodid von der Säule eluiert wurden.
2. Die an den Ankergruppen des Austauschers verbliebenen H^+ -Gegenionen wurden sodann mit einem Überschuß eines Kaliumsalzes gegen K^+ -Ionen ausgetauscht und damit für den dritten Schritt vorbereitet.
3. Mit einem basischen Elutionsmittel wurden die an die Säulen adsorbierten Schilddrüsenhormone gelöst und in einem möglichst kleinen Volumen von der Säule gewaschen.

Repräsentativ für alle Versuche, mit Hilfe eines Kationenaustauschers eine reine T_3 -Fraktion zu erhalten ist hier das Ergebnis eines Versuchsaufbaus beschrieben und wiedergegeben.

Es wurden Glassäulen von 11 cm Länge (innerer Durchmesser: 4,6 mm) verwendet, die mit 0,7 ml gequollenen Geles (Sephadex SP C - 25) gefüllt wurden. Die 28° C temperierten Gelsäulen wurden mit 0,1 N HCl vorgespült und danach die Inkubationsgemische aus jeweils 100 µl Serum, T_3 -Tracer, T_4 -Tracer, bzw. unter Weglassung des eines Tracers mit 400 µl 0,1 N HCl mittels einer Proportionierpumpe kontinuierlich über die Säulen gepumpt. Bis zur 10. Minute wurde mit 0,1 N HCl weitergespült und dann mit 1 N KAc 5 Minuten aufgepuffert. Die Thyronine wurden mit 0,02 N KOH von der Austauschersäule gewaschen. Die Abbildung 22 zeigt im oberen Teil die jeweils erzielten Elutionsdiagramme.

Abbildung 22: Extraktion der Jodthyronine T_3 und T_4 aus dem Serum auf Kationenaustauschersäulen (oben) und Chromatographie der T_3 - und T_4 - Peaks auf Dextran-gelsäulen (unten). Erklärung siehe Text.



Während die Jodthyronine in einem sehr kleinen und schmalen Peak von der Säule gewaschen werden konnten (800 μ l von der 17,5. bis zur 22,5. Minute), scheiterte eine anschließend durchgeführte radioimmunologische Bestimmung des T_3 an dem Auftreten eines Blanks: Bereits ohne T_3 im Ansatz wurde der T_3 -Tracer in unterschiedlichem Maße aus seiner Bindung an den T_3 -Antikörper verdrängt.

4.2.1. Weiterauftrennung der Thyronine auf Dextrangelsäulen

Wir überprüften weiter die Möglichkeit, den von der Kationenaustauschersäule eluierten Thyronin-Peak in die beiden Hormonfraktionen T_3 und T_4 weiteraufzutrennen um dann die radioimmunologische Bestimmung nur in dem reinen T_3 -Eluat durchzuführen. Hierzu wurden die von der Kationenaustauschersäule abgetrennten Thyronine T_3 und T_4 getrennt auf alkalisierte 0,8 ml Sephadex G - 25 s.f. aufgetragen und diese mit Kaliumphosphatpuffer, pH 11,5 nachgespült (siehe Abbildung 22 unten). Der Jodidpeak lag mit 8 % der gesamt eingesetzten Radioaktivität von T_3 und 17,6 % von T_4 sehr hoch. Eine Kontamination des T_3 -Peaks durch T_4 konnte nicht verhindert werden. Darüber hinaus konnte auch bei dem anschließend durchgeführten Radioimmunoassay für T_3 keine reproduzierbare Eichkurve erstellt werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auf Kationenaustauschersäulen in der beschriebenen Art keine erfolgversprechende Abtrennung von T_3 und T_4 zu erzielen war, da es zu Verunreinigungen kam, die im Radioimmunoassay störten. Ebenfalls gelang es nicht, die Thyronine weiter aufzutrennen, da auch hier eine Verunreinigung der isolierten T_3 -Fraktion durch störende Substanzen nicht auszuschließen war.

4.3. Extraktion des T_3 aus dem Serum mit gleichzeitiger Abtrennung von T_4 auf Dextrangelsäulen

Während die Auftrennung eines T_3 - T_4 -Gemisches in Pufferlösung auf alkalisierten Sephadex G - 25 s.f.-Säulen in T_3 und T_4 keine Schwierigkeiten bereitete (35,39,72), verhinderte die starke Proteinbindung der spezifischen Serumproteine, insbesondere TBG (siehe 1.2.1.) eine ähnliche chromatographische Auftrennung von T_3 und T_4 im Serum. Erst die Überlegung, mit Hilfe einer der schon erwähnten TBG-blockenden Substanzen die Bindung des T_3 an die Serumproteine irreversibel zu verdrängen und über die Säulenchromatographie die Serumproteine chromatographisch von T_3 und T_4 abzutrennen, ermöglichte die Entwicklung des in dieser Arbeit vorgestellten Radioimmunoassay für T_3 . Wir nutzten bei der Verwendung des Dextrangeles Sephadex G - 25 s.f. eine weitere Eigenschaft dieses Geles, nämlich im alkalischen Milieu die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 unterschiedlich stark auf der Gelsäule zurückzuhalten, wodurch es uns gelang, nicht nur das T_3 von den Serumproteinen vollständig freizusetzen, sondern auch eine 100prozentige Abtrennung vom T_4 zu erzielen.

4.3.1. Gel und Säulenpräparation

Vergleichende Untersuchungen mit Sephadex G - 25 s.f.-Mengen von 1 - 2 ml in 11 cm langen Glasröhrchen ergaben eine ausreichende Adsorptionsfläche bei einem Volumen von 1,5 bis 2,0 ml gequollenem Gel, sodaß bei den weiteren Extraktionsversuchen eine konstante Gelmenge von 1,8 ml beibehalten werden konnte. Die Präparation der Gelsäulen ist unter 2.3.3.3.2.1. beschrieben.

4.3.2. pH-Wert der Extraktionssäule

Um die Gelsäulen für die Aufnahme des Inkubationsgemisches vorzubereiten, mußte das Gel alkalisiert werden. Dieses alkalische Milieu wurde durch etwa 5minütiges Spülen der Gelsäulen mit 0,1 N Natronlauge rasch erreicht. Zur Kontrolle der vollständigen Alkalisierung wurde das auslaufende Eluat auf seinen pH-Wert überprüft. Die Alkalisierung des Inkubationsgemisches auf einen pH-Wert von etwa 11 geschah durch Zugabe von 100 µl 0,04 N Kalilauge (siehe auch 2.3.3.2.2.). Die eigentliche Elution der Serumproteine, sowie von T_3 und T_4 erwies sich am günstigsten mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 11,5.

4.3.3. Zugabe von Natriumsalicylat

Im Gegensatz zu den Radioimmunoassays, bei denen T_3 unter Zuhilfenahme der sogenannten TBG-blockenden Substanzen direkt im Serum gemessen wird, bewirkte das von uns verwendete Natriumsalicylat in einer Menge von 1 mg/Ansatz in Verbindung mit der Säulenchromatographie lediglich eine vollständige Abtrennung aller Serumproteine. Eine Beeinflussung des sich an die Extraktion des T_3 anschließenden T_3 -Radioimmunoassays konnte ausgeschlossen werden (siehe unten). Die Abbildung 23 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm von radioaktiv markiertem T_3 und T_4 bei Zugabe in ein Normalserum bzw. einen physiologischen Natriumphosphatpuffer, pH 7,4. Die Parallelität der beiden Elutionskurven im Serum bzw. Puffer spricht für die Effektivität des Natriumsalicylates, auf alkalisierten Sephadex G - 25 s.f. - Säulen die Thyronine vollständig von den Proteinen zu lösen, die bis zur 25. Minute quantitativ von der Säule gespült wurden. Obwohl uns keine geeignete Methode zur Verfügung stand, das von den Säulen eluierte Natriumsalicylat quantitativ zu messen und analog zu der T_3 -Elution ein entsprechendes Elutionsdiagramm für Natriumsalicylat zu erstellen, berechtigten uns die ausgezeichneten Qualitätsteste (siehe 3.1.) zu der Annahme, daß bei dem an die T_3 -Extraktion sich anschließenden

Radioimmunoassay keine Störung durch möglicherweise noch im T_3 -Peak eluierten Natriumsalicylat eintritt.

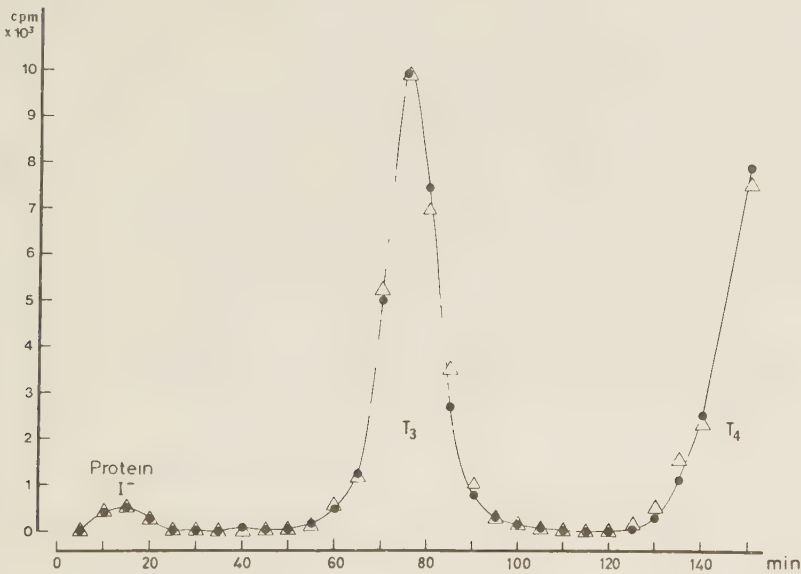


Abbildung 23: Elutionsdiagramm von radioaktivem T_3 und T_4 bei Anwesenheit von Serum (●) und Natriumphosphatpuffer (Δ) auf alkalisierten Sephadex G - 25 s.f. - Säulen

Die Inkubationsgemische bestanden aus 100 μ l Serum, bzw. Puffer, 50 μ l T_3 -Tracer, 50 μ l T_4 -Tracer, 100 μ l 1 % Natriumsalicylat und 100 μ l 0,04 N Kalilauge. Säulenzubereitung und Elution erfolgten wie unter 2.3.3.3.2. beschrieben.

4.3.4. Temperatureinfluß auf den Extraktionsschritt

Neben der Gelmenge, der Art der verschiedenen Elutionsmittel und der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches war die Temperierung der Extraktionssäulen von entscheidender Bedeutung für den zeitlichen Ablauf des Extraktionsschrittes. Die Abbildung 24 verdeutlicht den Temperatureinfluß der Gelsäulen auf das zeitliche Erscheinen des T_3 im Eluat und auf die Breite des T_3 -Peaks.

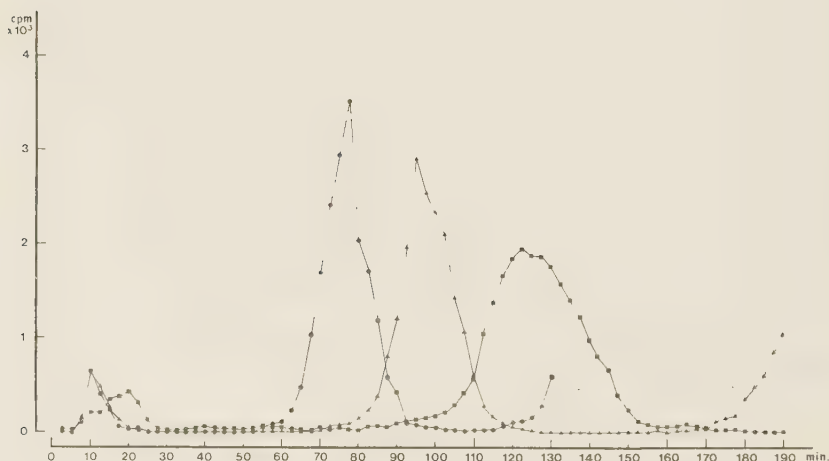


Abbildung 24: Temperaturabhängigkeit der T_3 -Extraktion auf
Sephadex G - 25 s.f. - Säulen

Aufgezeichnet sind die bei 20° C (■), 30° C (▲) und 37° C (●) erzielten Elutionskurven von einem Inkubationsgemisch aus 100 µl Poolserum, 50 µl T_3 -Tracer, 50 µl T_4 -Tracer, 100 µl 1% Natriumsalicylat und 100 µl 0,04 N Kalilauge.

Die Extraktion bei 37° C bot gegenüber den anderen Temperaturen die Vorteile eines geringeren Zeitaufwandes und eines relativ kleinen Volumens des T₃-Eluates von etwa 5,8 ml. Höhere Reaktionstemperaturen mit vermutlich noch vorteilhafterer Abtrennung von T₃ konnten aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, da mit steigenden Temperaturen die Schlauchverbindungen des Pumpsystems undicht wurden.

4.4. Radioimmunologische Bestimmung von T₃ nach Extraktion des T₃ aus dem Serum und Abtrennung des T₄

Mit der erfolgreichen Extraktion des T₃ aus dem Serum und der gleichzeitigen Abtrennung von T₄ stellte sich die Frage, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen T₃ und T₃-Antikörper in einem solch großen Volumen von 5,8 ml überhaupt möglich ist, aber in noch größerem Maße die Frage, wie bei einem solch großen Volumen eine erfolgreiche und reproduzierbare Auftrennung von Antikörper-gebundenem und Antikörper-freiem T₃ durchzuführen ist.

4.4.1. Bound/Free-Trennung

Bei dem großen T₃-Eluat von 5,8 ml kam eine Bound/Free-Trennung mit einem zweiten Antikörper nicht in Frage- es werden dabei Volumina nur bis etwa 1 ml verwendet- weswegen wir uns für eine chromatographische Auftrennung der Bound- und Free-Fractionen auf Dextransäulen entschlossen, da in unserem Labor mit dieser Art der Auftrennung verschiedener Substanzen im Vergleich zu anderen Methoden gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Das Vorgehen, das wir für die Bound/Free-Trennung wählten, entspricht im wesentlichen dem in unserem Labor verwendeten T₃-in vitro-Test (2.3.1.2.). Es ist schematisch in der Abbildung 2 und 3 wiedergegeben. Nach der Inkubation des T₃-Eluates mit dem zugesetzten T₃-Antikörper wurde dieses Inkubationsgemisch quantitativ aus den Inkubationsgefäßen durch eine Proportionier-

pumpe auf 2 ml Sephadex - G - 25 s.f. - Säulen aufgebracht und mit 0,05 M Barbitalpuffer, pH 8,6, weitergespült. Der Antikörper-gebundene Teil des T_3 wurde dabei bis zur 28. Minute eluiert und der an das Sephadex gebundene freie Teil mit einem Überschuß an Nachwaschserum quantitativ von den Säulen gewaschen. (vgl. 2.3.3.3.2.4.)

4.4.2. Beeinflussung des T_3 -Radioimmunoassays durch verschiedene Endvolumina der T_3 -Euate

Um die Frage nach der Beeinflussung des Radioimmunoassays und des Trennvorganges in Bound und Free durch unterschiedliche Inkubationsvolumina auszutesten, wurden T_3 -Standards (0 pg/100 μ l und 100 pg/100 μ l) mit T_3 -Tracer in einem Volumen von 1 ml 0,05 M Barbitalpuffer, pH 8,6, angesetzt und auf verschiedene Endvolumina (bis 7 ml) weiterverdünnt. Diese Versuchsreihe wurde dann mit T_3 -Antiserum versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Auftrennung in Bound und Free geschah dann in der oben beschriebenen Weise (vgl. 4.4.1.).

Die Abbildung 25 zeigt die prozentualen Bound-Raten bei verschiedenen Inkubationsvolumina. Sowohl für den 0-Standard wie auch für den 100 pg-Standard läßt sich keine wesentliche volumenspezifische Abweichung nachweisen. Gleichzeitig konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, daß das eingeschlagene Verfahren zur Bound/Free-Trennung gute Ergebnisse liefert.

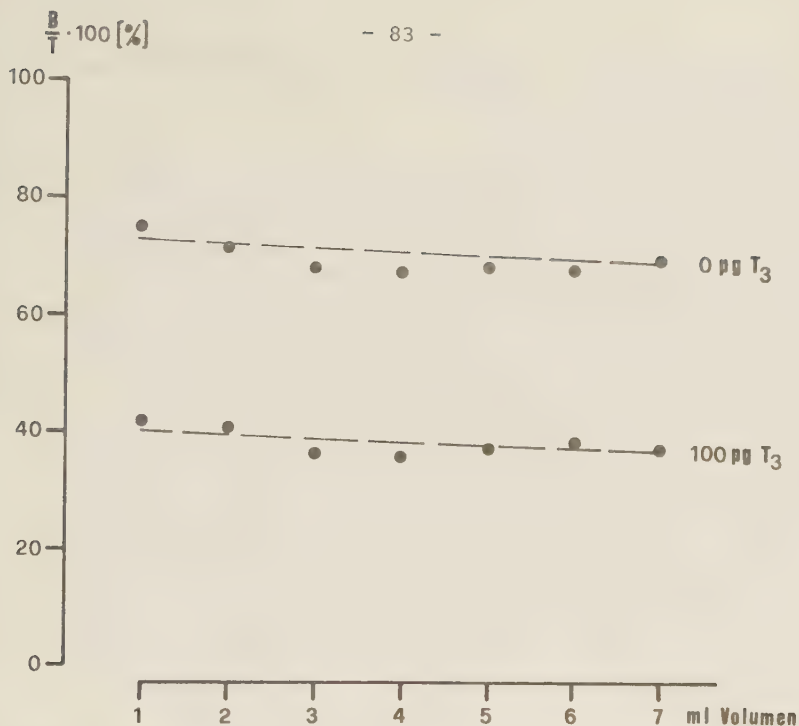


Abbildung 25: T_3 -Radioimmunoassay in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsvolumina

Beeinflussung der auf der Abszisse aufgetragenen Inkubationsvolumina auf die prozentuale Boundrate der T_3 -Standards 0 pg und 100 pg.

4.4.3. T_3 -Antiserumkonzentration

Orientierend für die optimale Antiserumkonzentration ist eine Bindungskapazität eines O-Standards von 50% (27). Darunter versteht man das Verhältnis von der durchschnittlich gebundenen Radioaktivität beim Standard 0 zu der durchschnittlichen Gesamtaktivität. Sie berechnet sich: $\frac{IpM \text{ (Nullstandard)}}{IpM \text{ (Gesamtaktivität)}} \times 100 \%$. Eine derartige optimale Bindungskapazität wurde bei einem Gesamtvolumen von 6 ml durch Zugabe einer Antiserumkonzentration von 1:4250 erreicht (vgl. 2.1.7.).

4.4.4. pH-Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion und Umpufferung des T_3 -Eluates

Zur Beantwortung der Frage nach der günstigsten pH-Einstellung des Antigen-Antikörper-Inkubationsgemisches wurden T_3 -Nullstandards mit T_3 -Tracer in Pufferlösungen mit verschiedenem pH angesetzt und nach Zugabe des T_3 -Antiserums in der Verdünnung 1:4250 und Inkubation über 36 Stunden bei Zimmertemperatur in Antikörper-gebundenen und -freien Teil aufgetrennt. Die Abbildung 26 verdeutlicht die gefundene Abhängigkeit der Bindungsreaktion von T_3 und T_3 -Antiserum durch unterschiedliche pH-Werte der Inkubationslösungen. Die prozentualen Boundraten zeigten bei pH-Werten zwischen 6,2 und 8,6 keine wesentlichen Unterschiede. Bei einem Anstieg des pH über 9 war allerdings eine deutliche Abnahme der Antikörperbindung an T_3 festzustellen. Um das mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer von der Extraktions säule gewaschene T_3 -Eluat auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8 einzustellen, wurde es vor der Inkubation mit dem spezifischen T_3 -Antiserum durch Zugabe von 100 μ l 0,9 N Salzsäure umpuffert.

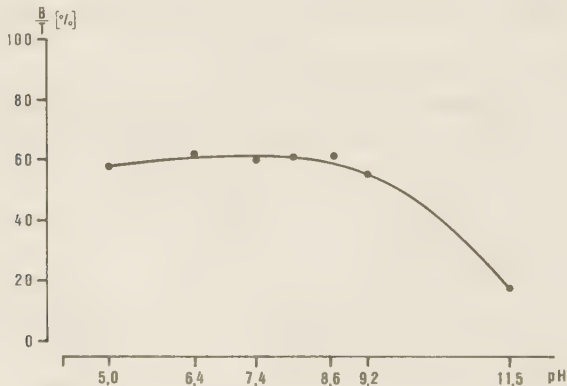


Abbildung 26: Abhängigkeit der Bindungsreaktion des T_3 mit dem
 T_3 -Antikörper von dem pH-Wert des Inkubationsge-
misches

4.4.5. Verhinderung der Wandadsorption

Außer im alkalischen Milieu wird kaltes und radioaktiv markiertes T_3 an die Wand der von uns verwendeten Polystyrolplexiglasröhrchen gebunden. Diesem Phänomen begegnete man bei der Erstellung der Eichstandards wie auch der markierten Substanzen durch Zusetzen einer 0,25%igen Rinderalbuminlösung zu dem Lösungsmittel (2.1.1. und 2.1.2.). Durch den Extraktionsschritt in unserer Bestimmungsmethode für T_3 werden aber diese Proteine, ebenso wie auch die Serumproteine quantitativ von dem T_3 abgetrennt, so daß einzig das alkalische Milieu des T_3 -Eluates eine meßbare Wandadsorption des sich frei in Lösung befindlichen T_3 verhindert. Durch die Notwendigkeit der Umpufferung auf ein pH von 7-8 (4.4.4.) ergab sich erneut die Frage, mit welcher Substanz vor der Umpufferung eine Wandadsorption an das Inkubationsgefäß verhindert werden könnte. Da die neuerliche Zugabe einer Albuminlösung zum T_3 -Eluat sicher die Bindungsverhältnisse zwischen T_3 und T_3 -Antikörper beeinflusst hätte, suchten wir nach einer anderen geeigneten Substanz, die eine solche Interferenz ausschloß. Es zeigte sich, daß eine Haemaccelzugabe von 100 μ l in einer 0,35%igen Konzentration die Adsorption des T_3 an die Reagenzglaswand von 3,8 auf 0,4 % verringern konnte und keinen Einfluß auf die Bindungsreaktion von T_3 und T_3 -Antikörper ausübte. Da der Verlust von 0,4 % an die Reagenzglaswand sowohl markiertes als auch unmarkiertes T_3 gleichermaßen einschloß, war der durch diesen Mechanismus verursachte Fehler stets gleich und wurde durch die Erstellung der Eichkurve ausgeglichen.

4.4.6. Temperaturabhängigkeit und Inkubationszeit

Um die Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Äquilibrierungsvorganges zwischen T_3 und T_3 -Antikörper auszutesten, wurden die T_3 -Elate nach Zugabe des T_3 -Antiserums bei 4° C, bei Zimmertemperatur und bei 37° C im Wärmebad verschieden lang inkubiert und anschließend in die Bound- und Free-Fraktion aufgetrennt (siehe Abbildung 27).

Das ab der 4. Stunde bis zur 170. Stunde nahezu gleichbleibende Bindungsverhältnis bei einer Inkubationstemperatur von 22°C garantierte uns in diesem Zeitraum stets gleiche reproduzierbare Verhältnisse und machte die Bound/Free-Trennung nahezu zeitunabhängig. So konnte bei einem eiligen T_3 -Wert noch am gleichen Tag die Auftrennung in Bound und Free erfolgen oder aber wie im Routinebetrieb am folgenden oder darauffolgenden Tag. Praktisch wurde von uns eine konstante Inkubationszeit von 36 Stunden gewählt. Eine Inkubation bei 4°C ist wegen des langsam ansteigenden Kurvenverlaufs nicht durchführbar gewesen, zumal sich zu keinem Zeitpunkt ein Plateau in dem Bindungsverhältnis einstellen ließ. Ebenfalls ungeeignet schien uns eine Inkubationstemperatur bei 37°C , da einmal nicht die hohen Bindungsraten wie bei 22°C erreicht wurden und zum anderen mit Zunahme der Inkubationszeit die Bindung des T_3 an den Antikörper wieder abnahm, möglicherweise bedingt durch zunehmende Denaturierung des T_3 -Antiserums und/oder einen immunologischen Aktivitätsverlust des T_3 -Antiserums bei 37°C .

4.5. Optimierung des T_3 -Radioimmunoassays durch Reinigung des T_3 -Tracers im Extraktionsschritt

Bei der hier vorgestellten Extraktionsmethode für T_3 ergab sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der T_3 -Tracer in die Reaktion eingegeben werden sollte. Zum einen bot sich die Möglichkeit an, den Tracer vor dem Extraktionsschritt zu dem Inkubationsgemisch aus T_3 -Standard, bzw. unbekannter Serumprobe hinzuzugeben, zum anderen aber war es auch möglich, den Tracer nach dem Extraktionsschritt in das chromatographisch abgetrennte T_3 -Eluat zu geben. Die Abbildung 27 verdeutlicht anhand zweier Eichkurven das Resultat dieses unterschiedlichen Vorgehens.

Wenngleich bei erster Betrachtung keine wesentliche Verbesserung der Eichkurve bei Bevorzugung des einen oder anderen Vorgehens erkennbar ist, wies die Vorinkubation des T_3 -Tracers, d.h. die Zugabe des Tracers vor dem Extraktionsschritt entscheidende

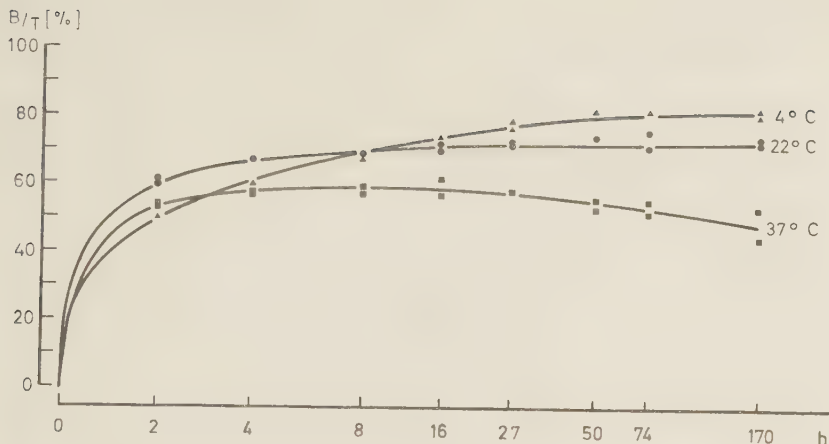


Abbildung 27: Kinetik der Gleichgewichtseinstellung zwischen T_3 und T_3 -Antikörper in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur

Das Inkubationsgemisch bestand aus dem T_3 -Eluat eines O-Standards, zu dem 100 μ l Haemaccel, 100 μ l 0,9 N HCl und 100 μ l des T_3 -Antiserums in einer Verdünnung von 1:4250 hinzugegeben wurden. Auf der Ordinate sind die prozentualen Bindungsraten aufgetragen, auf der Abszisse die jeweiligen Inkubationszeiten. ($\blacktriangle$): 4°C, ($\bullet$): 22°C und ($\blacksquare$): 37°C.

Vorteile auf:

Da einmal der Tracer in einer Rinderalbuminlösung angesetzt (vgl. 2.1.1.) und damit nicht proteinfrei war, zudem durch den natürlichen Zerfall Jodverunreinigungen aufwies und durch Alterungsprozesse Aktivitätsverluste erlitt, bot sich durch die gleichzeitige Chromatographie des Tracers auf der Extraktionssäule die Möglichkeit, diese störenden Substanzen in der

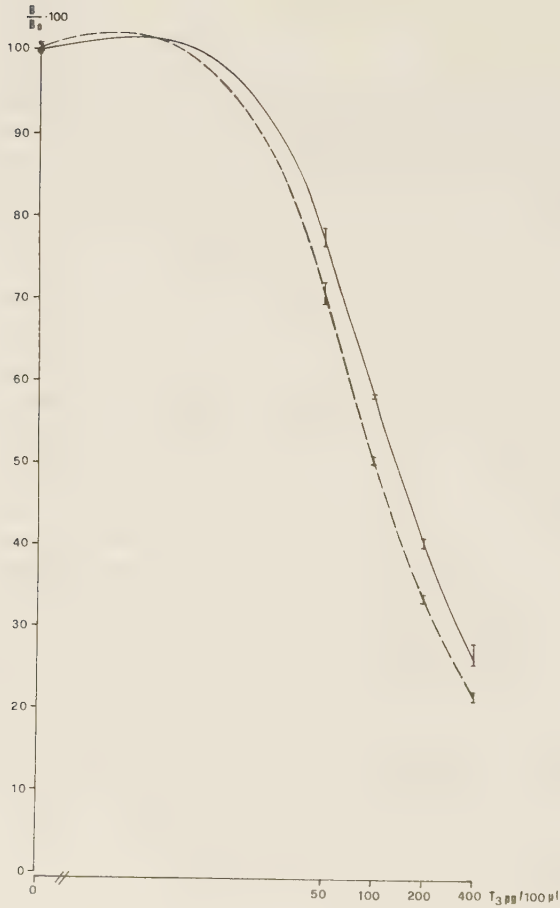


Abbildung 27: Standardeichkurven für T_3 bei Zugabe des T_3 -
Tracers vor (---) und nach Extraktion des T_3
(—)

Tracerlösung zu eliminieren. Damit war gleichzeitig gewährleistet, daß die gesamte im T_3 -Peak gemessene Radioaktivität ausschließlich von radioaktiv markiertem T_3 herrührte.

Für die Erstellung der in der Abbildung 27 dargestellten Eichkurven wurde ein frisch angesetzter Tracer verwendet. So ist die höhere Bindungsrate bei nachträglicher Zugabe des T_3 -Tracers wohl vornehmlich durch das sich in der Tracerlösung befindende Rinderalbumin zu erklären. Durch die gleichzeitige Extraktion des radioaktiv markierten T_3 aus dieser Rinderalbuminbindung fällt dieser Effekt weg.

Neben dem Vorteil der internen Reinigung des T_3 -Tracers durch den Chromatographieschritt gestattete uns die Messung der Radioaktivität in dem gesammelten T_3 -Eluat eine Kontrolle über die Vollständigkeit des T_3 -Peaks. Fehler bei der Extraktion wie defekte Pumpschläuche, gelöste Verbindungen, zu rasche oder zu langsame Pumpgeschwindigkeiten einzelner Säulensysteme konnten so erkannt und ausgeschaltet werden.

5. Diskussion

5.1. Methode

Das Trijodthyronin (T_3), das erst 1952, 40 Jahre nach dem Thyroxin entdeckte zweite Schilddrüsenhormon hat heute aufgrund seiner größeren biologischen Wirksamkeit und seiner eigenständigen Bedeutung bei einer Reihe von Schilddrüsenerkrankungen ein besonderes Interesse in der klinischen Schilddrüsendiagnostik erlangt. Daher war es in den vergangenen Jahren Ziel vieler Arbeitsgruppen, eine exakte und einfach durchführbare Methode zur Bestimmung dieses Hormons zu entwickeln. Schwierigkeiten bereiteten die nahe chemische Verwandtschaft mit dem T_4 , das sich nur durch eine zusätzliche Jodsubstitution an der 5-Position des β -Phenolringes vom T_3 unterscheidet und in ungleich größerer Konzentration im Serum vorliegt (1.2.2.), sowie vor allem die feste Bindung beider Hormone an die spezifischen Serumtransportproteine (1.2.1.). Einen großen Fortschritt in der T_3 -Messung stellte die Entwicklung des Radioimmunoassays dar. Das Prinzip dieser Methode setzt aber voraus, daß neben dem eingesetzten spezifischen Antiserum keine weiteren Bindungsstellen für T_3 in dem Assay vorhanden sein dürfen, d.h. der Einfluß des spezifisch T_3 -bindenden TBG's muß ausgeschaltet werden. Viele Radioimmunoassays für T_3 wurden beschrieben, bei denen eine zum Serum hinzugegebene TBG-blockierende Substanz das T_3 aus der Proteinbindung lösen soll. Jedoch sind diese beschriebenen Methoden nicht fehlerfrei: Zum einen gelingt die TBG-Blockierung nicht vollständig, und zum anderen kommt es zu einer Kreuzreaktion der blockierenden Substanz mit dem spezifischen T_3 -Antikörper. Daher entschlossen wir uns, einen Radioimmunoassay für T_3 zu entwickeln, der eine vorherige quantitative Extraktion des T_3 aus dem Serum unter gleichzeitiger Abtrennung von T_4 beinhaltet. Diese von uns entwickelte Methode zur T_3 -Bestimmung ist allerdings methodisch sehr aufwendig und bei einer Kapazität von 75 Einzelbestimmungen in 2 Tagen für den klinischen Routinebetrieb nicht geeignet.

Aufgrund der Spezifität und Richtigkeit eignet sie sich vor allem als "Referenzmethode" und zur Bearbeitung spezieller wissenschaftlicher Fragestellungen, vor allem bei unterschiedlichen Konzentrationen an TBG und T_4 .

5.2. Klinische Bedeutung der T_3 - Bestimmung

5.2.1. Hypothyreose

Für die Diagnosestellung der Hypothyreose ist die Bestimmung des T_3 im Serum wenig hilfreich, da ein erniedrigter T_4 - Wert als wesentlicher Laborparameter zur Bestätigung einer Hypothyreose ausreicht und die Differenzierung zwischen primärer und sekundärer Hypothyreose anhand der TSH-Spiegel erfolgt. Die exakte T_3 - Messung ist hier mehr von wissenschaftlichem Interesse, da die T_3 - Spiegel, insbesondere bei der primären Hypothyreose, zum Teil noch im Bereich der Norm liegen und in Einzelfällen sogar über die Norm erhöht sind. Diese deutlich ausgeprägte T_3 - Restsekretion ist möglicherweise Ausdruck einer präferentiellen Stimulation der T_3 - Sekretion durch die bei der primären Hypothyreose erhöhten TSH- Spiegel. Auch die normalen, oder sogar erhöhten T_3 - Spiegel reichen in diesen Fällen jedoch zur Aufrechterhaltung einer Euthyreose nicht aus.

Bei der sekundären Hypothyreose dagegen fehlt bei primär gesunder Schilddrüse die thyreotrope Stimulation durch TSH. Als Hinweis für die Bedeutung des TSH bei der T_3 - Restsekretion lagen die T_3 - Spiegel bei diesen Patienten deutlich niedriger als bei den Patienten mit primärer Hypothyreose. Das TSH kann aber nicht alleine für die T_3 - Restsekretion verantwortlich gemacht werden, denn der T_3/T_4 -Quotient liegt bei der sekundären Hypothyreose mit $30,3 \pm 17$ ($x \pm s$) deutlich über dem des Normalkollektivs mit $17,9 \pm 4,0$. Hypothetisch deuteten wir dieses Phänomen der T_3 - Restsekretion bei der Hypothyreose als eine aktivere thyreoidale Konversion von T_4 zu T_3 auf niedrigem T_4 - Niveau (56).

5.2.2. Blande Struma

Bei den Patienten mit blander Struma liegen die T_4 - Spiegel im Normalbereich, sie sind jedoch im Vergleich mit schilddrüsen-gesunden Personen im Mittel erniedrigt. Dennoch liegt keine Hypothyreose vor, wie sich an den normalen TSH- Spiegel ablesen läßt. Bei einem nicht geringen Teil dieser Patienten von etwa 20% deutet ein erhöhter Anstieg der TSH- Spiegel beim TRH- Test auf einen Schilddrüsenhormonmangel hin (praeklinische Hypothyreose (vgl. 81,82)). Jetzt konnten mit Hilfe der radioimmunologischen T_3 - Bestimmung bei diesen Struma- Patienten, verglichen mit schilddrüsennormalen Kontrollpersonen, signifikant erhöhte T_3 - Spiegel nachgewiesen werden. Durch diese kompensatorische T_3 - Mehrsekretion kann normalerweise eine euthyreote Stoffwechsellaage aufrechterhalten werden, abzulesen an den normalen TSH- Spiegel. Als eine wesentliche Ursache der Struma konnte mit den von uns durchgeführten Untersuchungen nochmals ein alimentärer Jodmangel aufgezeigt werden. In der Vorstellung, daß die Schilddrüse einen T_4 - Mangel dadurch auszugleichen versucht, daß sie ein geringes Jodangebot mit der Nahrung vermehrt durch einen ökonomischeren Jodeinbau in das jodsparendere Trijodthyronin vornimmt, substituierten wir bei Strumapatienten den Jodmangel durch orale Gabe von täglich 200 µg Jodid über 4 Wochen. Bei 3 von 4 Patienten führte dies zu einem deutlichen Anstieg der T_4 - Spiegel und gleichzeitig zu einem signifikanten Abfall der T_3 - Spiegel im Serum. Dieser Befund weist darauf hin, daß die Schilddrüse, um einen euthyreoten Zustand aufrecht zu erhalten, einen Jodmangel über eine kompensatorische Mehrsekretion von T_3 auszugleichen versucht und, daß diese T_3 - Mehrsekretion bei genügendem Jodangebot reversibel ist.

5.2.3. Hyperthyreose

Der Zustand einer Hyperthyreose liegt vor, wenn die Schilddrüse unabhängig von der hypophysär- hypothalamischen Kontrolle vermehrt Schilddrüsenhormone produziert. Gesichert wird sie normalerweise durch den Nachweis erhöhter zirkulierender Schilddrüsenhormonspiegel und supprimierter TSH- Spiegel im Serum.

Von der klassischen Hyperthyreose mit erhöhten Spiegel von T_4 und T_3 läßt sich heute die T_3 - Hyperthyreose abgrenzen, bei der definitionsgemäß isoliert die T_3 - Spiegel erhöht sind bei normalem oder sogar erniedrigtem T_4 und supprimierter TSH- Ausschüttung (fehlender TSH- Anstieg im TRH- Belastungstest). Gefunden werden diese T_3 - Hyperthyreosen gehäuft bei Patienten mit dekompensiertem autonomem Adenom (vgl. 3.2.5.) und endokriner Ophthalmopathie (vgl. 3.2.6.). Streng abzugrenzen von dieser T_3 - Hyperthyreose sind die Fälle mit ebenfalls erhöhten T_3 - Spiegel, ohne daß eine Hyperthyreose vorliegt. Derartige "euthyreote Hypertrijodthyroninämien" findet man als kompensatorische T_3 - Mehrsekretion bei der blanden Struma (vgl. 5.2.2.) und gelegentlich als T_3 - Restsekretion bei primärer Hypothyreose (vgl. 5.2.1.). Die sichere Differenzierung zwischen der T_3 - Hyperthyreose und der euthyreoten Hypertrijodthyroninämie erlaubt die TSH-Bestimmung: Bei der T_3 - Hyperthyreose sind die TSH- Spiegel supprimiert und steigen beim TRH- Belastungstest nicht an, während die TSH- Spiegel bei der "euthyreoten Hypertrijodthyroninämie" normal stimulierbar sind.

5.2.4. Untersuchungen zur Rückkopplung von T_3 und T_4 auf die TSH- Sekretion

Unter dem Aspekt der biologischen Bedeutung des T_4 - eigenständige Bedeutung oder nur Prohormon von T_3 - wurde der Verlauf der TSH- Spiegel bei primär hypothyreoten Patienten nach einzelnen Gaben von T_3 und T_4 verfolgt. Auf hohe Dosen von sowohl T_3 als auch T_4 kam es mit den erhöhten Serumspiegeln von T_3 , bzw. T_4

zu einem prompten Abfall der TSH- Spiegel. Dieser Abfall der TSH- Spiegel erfolgte nach Verabreichung von T_4 zu einem Zeitpunkt, an dem noch kein Anstieg der T_3 - Spiegel im Serum als Folge der peripheren Konversion von T_4 zu T_3 nachweisbar war. Dieser Befund deutet auf eine eigenständige Bedeutung des T_4 neben dem T_3 hin. Eine mögliche Konversion von T_4 zu T_3 auf zellulärer Ebene in der Hypophyse, als Ursache für die Suppression der TSH- Sekretion, kann allerdings durch den fehlenden Anstieg der T_3 -Spiegel im Serum nicht ausgeschlossen werden.

Zur Frage der Rückkopplung zwischen dem hypothalamischen TRH und hypophysären TSH untersuchten wir den Einfluß von exogen verabreichtem synthetischen TRH auf die Serumspiegel von TSH, T_3 und T_4 . Nach akuter intravenöser Gabe von 200 μ g TRH und anschließender Infusion von 800 μ g TRH über zwei Stunden stiegen zunächst die TSH- Spiegel und in deren Gefolge die T_3 - und T_4 - Spiegel kontinuierlich an. Trotz weiterer TRH- Stimulation fielen aber schließlich die TSH- Spiegel wieder ab. Als mögliche Ursache hierfür müssen entweder die Erschöpfung der hypophysären TSH- Reserve oder aber die Suppression des TSH durch die auf die TSH- Stimulation angestiegenen Serumspiegel von T_3 und T_4 angenommen werden.

Aus der bekannten Beobachtung heraus, daß einmal die exogene Verabreichung von TRH sowohl zu einem Anstieg des TSH, als auch des Prolaktins (hPRL) im Serum führt und zum anderen bei Patienten mit primärer Hypothyreose neben den erhöhten TSH- Spiegel n auch signifikant höhere Prolaktin- Spiegel als bei hyperthyreoten Patienten (vgl. 111) gefunden werden, untersuchten wir bei einem Patienten mit primärer Hypothyreose die TSH- und Prolaktin- Spiegel nach oraler Gabe von T_3 und T_4 . Sowohl nach T_3 als auch nach T_4 - Applikation fanden wir einen nahezu parallelen Abfall der Prolaktin- Spiegel mit den TSH- Spiegeln, was als möglicher Hinweis auf einen negativen Feedback zwischen den Schilddrüsenhormonen T_3 und T_4 einerseits, und dem TRH andererseits, gedeutet werden könnte.

6. Zusammenfassung

Wegen der bekannten Fehlermöglichkeiten bei der Messung von T_3 im unextrahierten Serum wurde von uns ein Verfahren entwickelt, bei dem vor der radioimmunologischen T_3 - Bestimmung das T_3 chromatographisch aus dem Serum extrahiert und gleichzeitig von T_4 abgetrennt wurde. Dieser spezifische TBG- und T_4 - unabhängige T_3 - Radioimmunoassay wurde nach dem Prinzip der simultanen Säulenchromatographie auf Sephadex G- 25- superfine - Säulen automatisiert.

Die Kreuzreaktion von T_4 in diesem T_3 - Radioimmunoassay lag unter 0,02%, während das T_3 - Antiserum selbst eine Kreuzreaktion mit T_4 von 0,17% aufwies. Die untere Nachweisgrenze der Methode war mit 15 pg/100 μ l zufriedenstellend. Die Wiederfinderaten von radioaktiv markiertem T_3 lagen bei $96 \pm 0,4\%$ ($x \pm s$). Die Wiederfinderaten von T_3 - Eichstandards, die dem Serum eines hypothyreoten Patienten zugegeben wurden, waren mit dem Regressionskoeffizienten von $b = 1,008$ und einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,999$ sehr gut. Die Präzision in der Serie war bei einem Variationskoeffizienten von 6,5% ($\bar{x} = 102,8 \pm 6,7$ pg/100 μ l, $n = 20$) zufriedenstellend, ebenso die Präzision von Tag zu Tag mit 8,4% ($\bar{x} = 106,8 \pm 8,9$ pg/100 μ l, $n = 20$). Die Methode war allerdings methodisch aufwendig und mit einer Kapazität von nur 75 Serumproben in zwei Tagen in 2 Tagen sehr zeitintensiv.

Bei einem schilddrüsengesunden Kontrollkollektiv lagen die T_3 - Spiegel im Serum bei $113,1 \pm 17,1$ pg/100 μ l ($\bar{x} \pm s$), $n = 36$). Hieraus errechnete sich ein Normalbereich von 80 - 150 pg/100 μ l.

Bei der klassischen Hyperthyreose sind sowohl die T_4 - als auch T_3 - Spiegel erhöht. Daneben gibt es die Fälle, bei denen die Symptomatologie einer Hyperthyreose durch isoliert erhöhte T_3 - Spiegel hervorgerufen wird. Die T_4 - Spiegel sind hierbei definitionsgemäß normal oder sogar erniedrigt, die TSH- Spiegel sind supprimiert und durch TRH nicht stimulierbar.

Diese Fälle von sog. T_3 -Hyperthyreose fanden wir gehäuft bei Patienten mit endokriner Ophthalmopathie und dekompensierten autonomen Adenomen der Schilddrüse.

Unter der thyreostatischen Behandlung mit Mercaptoimidazol oder Propylthiouracil fielen bei klassischer Hyperthyreose die T_3 - und T_4 - Spiegel im Serum nahezu parallel ab. Dieser parallele Abfall von T_4 und T_3 trotz deren unterschiedlicher biologischer Halbwertszeit erklärt sich aus der laufenden peripheren Konversion von T_4 zu T_3 . Bei T_3 -Hyperthyreosen mit normalen, bzw. erniedrigten T_4 -Spiegeln, fielen daher erwartungsgemäß die T_3 -Spiegel unter antithyreoidaler Behandlung wesentlich schneller ab.

Bei Patienten mit blander Struma waren im Vergleich mit Normalpersonen die T_4 - Spiegel im Mittel erniedrigt und die T_3 - Spiegel erhöht, während die TSH- Spiegel nicht wesentlich verändert waren. Diese kompensatorische T_3 - Mehrsekretion bei blander Struma war nach Substitution des Jodmangels bei diesen Patienten mit täglich 200 μg Kaliumjodid reversibel.

Bei hypothyreoten Patienten waren die T_3 - Spiegel im Mittel signifikant erniedrigt. Bei einem Teil der Patienten mit primärer Hypothyreose (hohe endogene TSH- Spiegel) lagen die T_3 - Spiegel aber noch im Normalbereich oder waren sogar erhöht. Diese " T_3 - Restsekretion" war bei den Patienten mit sekundärer Hypothyreose (inadäquat niedrige TSH- Spiegel) deutlich niedriger, abzulesen an dem mittleren T_3/T_4 - Quotienten von nur 30,3 gegenüber dem von 94,6 bei der primären Hypothyreose.

Als Hinweis auf eine eigenständige Bedeutung des T_4 neben dem T_3 konnte eine akute Suppression der TSH- Sekretion bei Patienten mit primärer Hypothyreose durch Verabreichung sowohl von T_3 als auch T_4 aufgezeigt werden. Diese TSH- Suppression erfolgte nach T_4 zu einem Zeitpunkt, wo noch kein Anstieg der T_3 - Spiegel aus einer peripheren Konversion von T_4 zu T_3 nachweisbar war.

7. LITERATUR:

1. ABUID, J., P. R. LARSEN
Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism
Comparison of the acute changes during therapy with
antithyroid agents.
J.Clin.Invest. 54, 201 (1974)
2. BELLABARBA, D., E. STERLING:
Formation of esters of thyroxine and triiodothyronine
during alcoholic extraction.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 29, 1510 (1969)
3. BENOTTI, J., R. GRIMALDI, S. PINO, F. MALOOF:
A modified method for total triiodothyronine (T_3) by
competitive protein binding.
In: Sixth International Thyroid Conference, Vienna 1970
p. 1121 (1971)
4. BINOUX, M. A., W. ODELE:
Use of dextran-coated charcoal to separate antibody
bound from free hormone: A critique.
J.Clin.Endocr. 36, 303 (1973)
5. BLÜMEL, K. R., K. HORN, P. C. SCRIBA:
Specificity of the radioimmunoassay for T_3 in serum.
Z.klin.Chem., 12, 233 (1974)
6. BOROWZAK, H.:
Methodische Probleme der getrennten Bestimmung von Tri-
jodthyronin und Thyroxin im Serum.
Dissertation, Universität München (1974)
7. BRAVERMAN, L. E., S. H. INGBAR, K. STERLING:
Conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3)
in athyreotic human subjects.
J.Clin.Invest. 49, 855 (1970)
8. BRAVERMAN, L. E., A. G. VAGENAKIS, P. DOWNS, A. FOSTER, K. STERLING,
S. H. INGBAR:
Effects of replacement doses of sodium-L-thyroxine on
the peripheral metabolism of thyroxine and triodo-
thyronine in man.
J.Clin.Invest. 52, 1010 (1973)
9. BROWN, B. L., R. P. EKINS, S. M. ELLIS, E. S. WILLIAMS:
The radioimmunoassay of tri-iodothyronine.
In: Sixth International Thyroid Conference,
Vienna 1970, p. 1107 (1971)

10. BROWN, B.L., R.P. EKINS, S.M. ELLIS, W.S. REITH:
Specific antibodies to triiodothyronine hormone.
Nature 226, 359 (1970)
11. BROWN, M.L., J. METHEANY:
Use of 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid in
radioimmunoassay of triiodothyronine.
J. Pharmaceut. Sciences 63, 1214 (1974)
12. BURGER, A., A. MOORE, C. SAKOloff, M.B. VALLOTTON, S.H. INGBAR:
Experience with serum triiodothyronine (T_3) measurements.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 177, 105 (1973)
13. CAMUS, M., M. FERNANDEZ, E. LIMBERT:
Circulating thyroid hormones and carrier proteins in
endemic goiter.
European Thyroid Association, Abstr. 88, Jerusalem (1973)
14. CHOPRA, I.J., D.H. SOLOMON, G.N. BEALL:
Radioimmunoassay for measurement of triiodothyronine in
human serum.
J. Clin. Invest. 50, 2033 (1971)
15. CHOPRA, I.J., R.W. LAM:
Use of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) in
radioimmunoassay (RIA) of triiodothyronine (T_3) in
unextracted serum.
Clin. Res. 20, 216 (1972)
16. CHOPRA, I.J., R.S. HO, R.W. LAM:
An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in
serum, its application to clinical and physiological
studies.
J. Lab. Clin. Med. 80, 729 (1972)
17. CHOPRA, I.J., D.H. SOLOMON, G.N. CHUA TECO:
Thyroxine: Just a prohormone or a hormone too?
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 1050 (1973)
18. DI STEFANO, J.J., K. WILSON, M. JANG, D.A. FISHER:
Tissue plasma interchange of T_4 and T_3 in man.
Endocrinology 92 (Suppl) 18 (1973)
19. DOCTER, R., G. HENNEMANN, H. BERNARD:
The use of a triiodothyronine (T_3) radioimmunoassay (RIA)
in different conditions of thyroid function and serum-
binding-capacities for thyroid hormone.
Europ. J. Clin. Invest. 3, 225 (1973)
20. DUSSAULT, J.H., R. LAM, D.A. FISHER:
The measurement of serum triiodothyronine by double
column chromatography.
J. Lab. Clin. Med. 77, 1039 (1971)

21. EKINS, R.P.:
The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique.
Clin.Chim.Acta 5, 453 (1960)
22. ERHARDT, F., I.MARSCHNER, C.R.PICKARDT, P.C.SCRIBA:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen TSH-Bestimmung.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 381 (1973)
23. ERHARDT, F., P.C.SCRIBA:
Probleme der radioimmunologischen hTSH-Bestimmung.
Arztl. Lab. 20, 191 (1974)
24. ESCOBAR DEL RAY, F., G.MORREALE DE ESCOBAR:
The effect of propylthiouracil, methylthiouracil and thiouracil on the peripheral metabolism of L-thyroxine in thyroidectomized, L-thyroxine maintained rats.
Endocrinology 69, 456 (1961)
25. ESCOBAR DEL RAY, F., G.MORREALE DE ESCOBAR, M.D.GARCIA GARCIA, J.MOURIZ GARCIA:
Increased secretion of thyrotrophic hormone in rats with depressed peripheral deiodination of thyroid hormone and a normal or high plasma PBI.
Endocrinology 71, 859 (1962)
26. EVERED, D., E.T.YOUNG, B.J.ORMSTON, R.MENZIES, P.A.SMITH, R.HALL:
Treatment of hypothyroidism: a reappraisal of thyroxine therapy.
Brit. Med. J. 1973/3, 131
27. FELDMANN, H., D.RODBARD:
Mathematical theory of radioimmunoassay.
In: Principles of competitive protein binding assay, chapter VII. Eds.: W.D.Odell, W.H.Daughaday, Philadelphia and Toronto: J.B.Lippincott Company (1971)
28. GHARIB, H., W.E.MAYBERRY, R.J.RYAN:
Determination of triiodothyronine concentration in human serums by radioimmunoassay (abstract).
J. Lab.Clin.Med. 76, 863 (1970)
29. GHARIB, H., R.J.RYAN, W.E.MAYBERRY, T.HOCKERT:
Radioimmunoassay for triiodothyronine (T_3): I. Affinity and specificity of the antibody for T_3 .
J.Clin.Endocr. 33, 509 (1971)
30. GILLICH, K.H., H.L.KRÜSKEMPER:
Klinische Untersuchungen zur Wirkungsgeschwindigkeit verschiedener Thyreostatika.
Dtsch. med. Wschr. 94, 314 (1969)

31. GREER, M.A., Y. GRIMM, H. STUDER:
Qualitative changes in the secretion of thyroid hormones induced by iodine deficiency.
Endocrinology 83, 1193 (1968)
32. GROSS, J., R. PITT-RIVERS:
The identification of 3,5,3'-L-triiodothyronine in human plasma
Lancet 1, 439 (1952)
33. GROSS, J., R. PITT-RIVERS:
Thyroid hormone physiology and biochemistry: triiodothyronine in relation to thyroid physiology.
Recent Progr. Horm. Res. 10, 109 (1954)
34. GUANSING, A.R., B.R. WEBSTER, B.C.W. HUMMEL:
Production of specific antibodies against triiodothyronine (T_3) (abstract).
Clin. Res. 19, 772 (1971)
35. GYERTYANFY, G., J. FÖLDES, E. KOLLIN:
Trennung vom markierten Trijodthyronin und Thyroxin mit Hilfe der Gelfiltrationsmethode.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 117 (1971)
36. HABERMANN, J., J. HENNER, K. HORN, I. zur HORST, P.C. SCRIBA:
Automatization of serum thyroxine determination and of T_3 -uptake test.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 159, 7 (1972)
37. HABERMANN, J.:
Quantitative Bestimmung von Schilddrüsenhormonen bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse.
Dissertation, Universität München (1974)
38. HABERMANN, J., H.G. HEINZE, K. HORN, R. KAUTLEHNER, I. MARSCHNER, J. NEUMANN:
Alimentärer Jodmangel in der Bundesrepublik Deutschland.
Dtsch. med. Wschr. 100, 1937 (1975)
39. HALLHUBER, G.:
Ein säulenchromatographisches Verfahren zur Auftrennung der Jodaminosäuren im Serum unter besonderer Berücksichtigung der Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin.
Dissertation, Universität München (1970)
40. HESCH, R.D., M. HÜFNER:
Highly specific antibodies to triiodothyronine.
Acta Biol. Med. Germ. 28, 861 (1972)
41. HESCH, R.D., M. HÜFNER, A. von zur MÜHLEN:
Erste klinische Ergebnisse mit einer radioimmunochemischen Bestimmungsmethode von Trijodthyronin im Plasma (T_3).
Dtsch. med. Wschr. 97, 351 (1972)

42. HESCH, R.D., D. EVERED:
Radioimmunoassay of T_3 in unextracted human serum.
Brit. Med. J. 196, 645³ (1973)
43. HESCH, R.D., A. v. z. MÜHLEN, D. EMRICH:
Hypertriiodothyroninemia
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173, 17 (1973)
44. HESCH, R.D.:
Pathophysiologie der Trijodthyroninproduktion.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2649 (1974)
45. HILGER, P., J. HERRMANN, H. L. KRÜSKEMPER:
Radioimmunologische Schnellmethode zur Messung von Trijodthyronin im Serum ohne Extraktion.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 323 (1973)
46. HOLLANDER, C.S.:
On the nature of the circulating thyroid hormone: Clinical studies of triiodothyronine and thyroxine in serum using gas chromatographic methods.
Trans. Ass. Amer. Physicians Philadelphia 81, 76 (1968)
47. HOLLANDER, C.S., L. SHENKMAN, T. MITSUMA, A. J. KASTIN, M. BLUM, D. G. ANDERSON:
Hypertriiodothyronaemia as a premonitory manifestation of thyrotoxicosis.
Lancet 2, 731 (1971)
48. HOLLANDER, C.S., N. NIHEI, S. Z. BURDAY, T. MITSUMA, L. SHENKMAN, M. BLUM:
Clinical and laboratory observations in cases of triiodothyronine toxicosis confirmed by radioimmunoassay.
Lancet 1, 609 (1972)
49. HOLLANDER, C.S., T. MITSUMA, L. SHENKMAN, P. WOLF, M. C. GERSHENGORN:
Thyrotropin - releasing hormone: evidence for thyroid response to intravenous injection in man.
Science 175, 209 (1972)
50. HORN, K., R. LANDGRAF, T. RUHL, P. C. SCRIBA:
Verbesserte mikrochemische Jodbestimmung von Schilddrüsenhormonen.
Z. Anal. Chem. 252, 267 (1969)
51. HORN, K., J. HENNER, P. C. SCRIBA:
Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. II. Automatisierter T_3 -in vitro-Test.
Dtsch. Ges. Klin. Chem. Mittlg. 2, 29 (1971)
52. HORN, K., T. RUHL, P. C. SCRIBA:
Semiautomatic method for the separation and determination of total triiodothyronine and thyroxine in serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 99 (1972)

53. HORN,K., J.HABERMANN, J.HENNER, I.zur HORST, P.C.SCRIBA:
Automatisierte Schilddrüsenhormonanalytik im Serum: T_3 -
in vitro-Test und Gesamtthyroxin (CPB).
Z.anal.Chem. 259, 222 (1972)
54. HORN,K., J.HENNER, P.C.SCRIBA:
Mechanisierte Analytik von Schilddrüsenhormonen im Serum:
 T_4 (CPBA), T_3 -in vitro-Test und Gesamt- T_3 (RIA).
Ärztl. Lab. 20, 177 (1974)
55. HORN,K., R.BLÜMEL, D.KOEPPEN, P.C.SCRIBA:
Radioimmunoassay for T_3 in serum: Necessity of prior
extraction.
Acta endocr.Suppl. 184, 73 (1974)
56. HORN,K.:
Trijodthyronin (T_3):Zur Bestimmung und pathophysiologi-
schen Bedeutung.
Urban & Schwarzenberg-Verlag, München-Berlin-Wien.(1976)
57. IVY,H.K., H.W.WAHNER, C.A.GORMANN:
"Triiodothyronine (T_3) toxicosis". Its role in Graves'
disease.
Arch.intern.Med. 128, 529 (1971)
58. KAISER,H.:
Zur Definition der Nachweisgrenze, der Garantiegrenze und
der dabei benutzten Begriffe.
Z.analyt.Chem. 216, 80 (1966)
59. KENDALL,E.C.:
The isolation in cristalline form of the compound
containing iodine which occurs in the thyroid.
J.Amer.Med.Ass. 64, 2042 (1915)
60. LARSEN,P.R.:
Triiodothyronine (T_3) in human serum: determinations
based on methodological improvements (abstr.)
Clin.Res. 18, 603 (1970)
61. LARSEN,P.R.:
Technical aspects of the estimation of triiodothyronine
in human serum:Evidence of conversion of thyroxine to
triiodothyronine during assay.
Metabolism 20, 609 (1971)
62. LARSEN,P.R.:
Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum.
J.Clin.Invest. 51, 1939 (1972)
63. LAUNAY,M.P.:
The effect of thiouracil on the pituitarythyroid axis:
A paradox in search of a solution.
Rev.Canad.Biol. 24, 299 (1965)

64. LAWTON, N.F., E.S. WILLIAMS, P. PHAROAH, R. EKINS, S.M. ELLIS:
Serum triiodothyronine concentration in subjects from an
area of endemic goitre.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 177, 214 (1973)
65. LERMAN, J.:
The physiological activity of L-triiodothyronine.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 13, 1341 (1953)
66. LIEBLICH, J., R.D. UTIGER:
Triiodothyronine radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 51, 157 (1972)
67. MALKUS, H., R.K. DONABEDIAN:
Triiodothyronine radioimmunoassay: A study of the inter-
actions of T_3 with anti- T_3 antisera and with thyroxine
binding globulin in the presence of ANS (ammonium-8-
anilino naphthalene-1-sulfonate).
Clin. Chim. Acta 51, 191 (1974)
68. MARSCHNER, I., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERSDORFER, B. POPP,
C. RINGEL, P.C. SCRIBA:
Berechnung radioimmunologischer Messerte mittels Spline-
Funktionen.
Ärztl. Lab. 20, 184 (1974)
69. MEINHOLD, H., K.W. WENZEL:
Zur Methodik der direkten radioimmunologischen Bestimmung
von Trijodthyronin im Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 477 (1974)
70. MITSUMA, T., M. GERSHENGORN, J. COLUCCI, C.S. HOLLANDER:
Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted
human serum.
J. Clin. Endocr. 33, 364 (1971)
71. MITSUMA, T., J. COLUCCI, L. SHENKMAN, C.S. HOLLANDER:
Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine
and thyroxine in unextracted serum
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 2107 (1972)
72. MOUGEY, E.H., J.W. MASON:
Separation of some iodoamino acids and iodide by gel
filtration.
Analyt. Biochem. 6, 223 (1963)
73. zur MÜHLEN, von A., R.D. HESCH, D. EMRICH, W. CREUTZFELDT:
Wirkung von synthetischem "thyreotropin-releasing factor"
auf Plasmaspiegel von thyreotropem Hormon und Wachstums-
hormon bei Gesunden, Patienten mit Hyperthyreose und
primärer Hypothyreose.
Dtsch. med. Wschr. 95, 2623 (1970)

74. NAUMANN, J.A., A. NAUMANN, S.C. WERNER:
Total and free triiodothyronine in human serum.
J.Clin.Invest. 46, 1346 (1967)
75. NICOLOFF, J.T., J.C. LOW, J.H. DUSSAULT, D.A. FISHER:
Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man.
J.Clin.Invest. 51, 473 (1972)
76. ODELL, W.D., J.F. WILBER, W.E. PAUL:
Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum.
J. Clin. Endocr. 25, 1179 (1965)
77. ODDIE, T.H., D.A. FISHER, W.M. MCCONAHEY, C.S. THOMPSON:
Iodine intake in the United States: A reassessment.
J.Clin.Endocr. 30, 659 (1970)
78. ODDIE, T.H., D.A. FISHER, J.H. DUSSAULT, C.S. THOMPSON:
Triiodothyronine turnover in euthyroid subjects.
J.Clin.Endocr. 33, 653 (1971)
79. OPPENHEIMER, J.H., H.L. SCHWARTZ, M.I. SURKS:
Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine
J.Clin.Invest. 51, 2493 (1972)
80. PATEL, Y.C., H.G. BURGER:
A simplified radioimmunoassay for triiodothyronine.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36, 187 (1973)
81. PICKARDT, C.R.:
Stimulation der TSH-Sekretion durch TRH (thyrotropin releasing hormone): Diagnostische Bedeutung und pathophysiologische Folgerungen. Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Universität München 1972.
82. PICKARDT, C.R., F. ERHARDT, J. GRÜNER, K. HORN, P.C. SCRIBA:
Stimulation der TSH-Sekretion durch TRH bei blander Struma: Diagnostische Bedeutung und pathophysiologische Folgerungen.
Klin.Wschr. 50, 1134 (1972)
83. PIND, K.:
Paper chromatographic determination of thyroid hormone (3:5:3'-triiodothyronine) in serum without radioiodine.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 26, 262 (1957)
84. PRILLER, J.:
Jodidausscheidung im Urin und Monojodtyrosinbelastungstest bei Strumapatienten.
Dissertation, Universität München, 1973.

85. ROBBINS, J., J.E. RALL:
The iodine-containing hormones, Hormones in Blood. Vol 1.
Second edition. Eds.: CH Gray, A.L. Bacharach. New York,
Academic Press, Inc. p.383 (1967)
86. ROCHE, J., S. LISSITZKY, R. MICHEL:
Sur la triiodothyronine, produit intermédiaire de la trans-
formation de la diiodothyronine en thyroxine.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 234, 997 (1952)
87. RUBENSTEIN, H.A., V.P. BUTLER, S.C. WERNER:
Progressive decrease in serum triiodothyronine concentra-
tions with human aging: Radioimmunoassay following ex-
traction of serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 247 (1973)
88. RUHL, T., J. HABERMANN, K. HORN, P.C. SCRIBA:
Separate determination of total T_3 and T_4 in serum by a
semiautomatic method.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 155, 8 (1971)
89. RUHL, T.:
Getrennte säulenchromatographische Bestimmung von T_3 und
 T_4 mittels mikrochemischer Jodbestimmung.
Dissertation, Universität München, 1974
90. RUSKIN T.W. AV, S.C. TANG, L. SHENKMAN, T. MITSUMA, C.S. HOLLANDER:
Serum triiodothyronine concentrations in infancy, child-
hood, adolescence and pediatric thyroid disorders.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 235 (1973)
91. SCHREIBER, B.E., H.M. ORTNER, G. LEB, O. EBER:
Klinische Beurteilung einer neuen Methode zur Bestimmung
des Serum-Trijodthyronins.
Acta endocr. Suppl. 70, 252 (1972)
92. SCHREIBER, B.E., H.M. ORTNER, H. SPITZY:
Chemische Bestimmung von Trijodthyronin im Blutserum.
Clin. Chim. Acta 36, 379 (1972)
93. SCHWARTZ, H.L., M.I. SURKS, J.H. OPPENHEIMER:
Quantitation of extrathyroidal conversion of L-thyroxine
to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in the rat.
J. Clin. Invest. 50, 1124 (1971)
94. SCRIBA, P.C., K. HORN:
Pathogenese und internistische Therapie der sogenannten
euthyreoten Struma.
Med. Klinik 64, 1737 (1969)
95. SCRIBA, P.C.:
Schilddrüsenerkrankheiten.
In: Endokrinologie für die Praxis, Teil I A. Lehmanns Ver-
lag, München, 1971

96. SCRIBA,P.C.:
Struma-Prophylaxe.
Internist 14, 330 (1973)
97. SCRIBA,P.C., E.KLEIN, J.KRACHT (Sektion Schilddrüse der Deutschen
Gesellsch. f. Endokrinologie):
Endemische Struma - Jodsalzprophylaxe.
Dtsch. med. Wschr. 100, 1350 (1975)
98. SINGER,P.A., J.T.NICOLOFF:
Estimation of the triiodothyronine secretion rate in
euthyroid man.
J.Clin.Endocr. 35, 82 (1972)
99. SNYDER,P.J., R.D.UTIGER:
Repetitive administration of thyrotropin-releasing
hormone results in small elevation of serum thyroid
hormones and in marked inhibition of thyrotropin response.
J. Clin. Invest. 52, 2305 (1973)
100. SNYDER,P.J., L.S.JACOBS, R.D.UTIGER, W.H.DAUGHADAY:
Thyroid hormone inhibition of the prolactin response to
thyrotropin-releasing hormone.
J.Clin.Invest. 52, 2324 (1973)
101. STERLING,K., D.BELLABARBA, E.S.NEWMAN, M.A.BRENNER:
Determination of triiodothyronine concentration in human
serum.
J.Clin.Invest. 48, 1150 (1969)
102. STERLING,K., M.A.BRENNER, E.S.NEWMAN:
Conversion of thyroxine to triiodothyronine in normal
human subjects.
Science 169, 1099 (1970)
103. STERLING,K., S.REFETOFF, H.A.SELENKOW:
 T_3 -thyrotoxicosis: Thyrotoxicosis due to elevated serum
triiodothyronine levels.
J.Amer.med.Ass. 213, 571 (1970)
104. STEVENSON,C., E.SILVA, G.PINEDA:
Thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3): Effects of
iodine on the serum concentrations and disposal rates
in subjects from an endemic goiter area.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38, 390 (1974)
105. STUDER,H., M.A.GREER:
Die Regulation der Schilddrüse bei Jodmangel. Huber-Verlag,
Bern und Stuttgart,(1966)

106. SURKS, M.I., A.R.SCHADLOW, J.H.OPPENHEIMER:
A new radioimmunoassay for plasma L-triiodothyronine:
Measurements in thyroid disease and in patients
maintained on hormonal replacement.
J.Clin.Invest. 51, 3104 (1972)
107. SURKS, M.I., A.R.SCHADLOW, J.M.STOCK, J.H.OPPENHEIMER:
Determination of iodothyronine absorption and conversion
of L-thyroxine (T_4) to L-triiodothyronine (T_3) using
turnover rate techniques.
J.Clin.Invest. 52, 805 (1973)
108. TREMBLAY, R., D.BELLABARBA:
Determination of serum triiodothyronine (T_3) by radio-
immunoassay.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 177, 104 (1973)
109. WAHNER, H.W., W.E.MAYBERRY, E.GAITAN, E.J.GAITAN:
Endemic goiter in the Canca Valley.III. Role of serum
TSH in goitrogenesis.
J.Clin.Endocr. 32, 491 (1971)
110. WAHNER, H.W.:
 T_3 Hyperthyroidism
Mayo Clin. Proc. 47, 938 (1972)
111. WERDER, von K.:
Wachstumshormone und Prolactinsekretion des Menschen.
Urban & Schwarzenberg-Verlag, München-Berlin-Wien 1975.
112. WERNER, S.C., G.ACEBEDO, I.RADICHEVICH:
Rapid radioimmunoassay for both T_4 and T_3 in the same
sample of human serum.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38, 493 (1974)
113. WILLIAMS, R.H.:
Textbook of endokrinologie
W.B.Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto
(1974)
114. WOEBER, K.A., S.H.INGBAR:
The interactions of the thyroid hormones with binding
proteins.
In: Greer, M.A. and Solomon, D.H., - Thyroid, Handbook of
Physiology. Washington, American Physiological
Society, 1973.
115. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1157 (1960)

LEBENS LAUF

Am 8. Mai 1944 wurde ich als Sohn des Berufssoldaten Alfred BLÜMEL und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Pahms in Görlitz geboren.

Nach der Ausweisung meiner Familie im Jahre 1945 wurde Rheydt am Niederrhein unser neuer Wohnsitz. Hier besuchte ich von 1950 bis 1958 die Volksschule und erlernte danach in einer dreieinhalbjährigen Lehre den Beruf des Starkstromelektrikers. Nach weiteren eineinhalb Jahren erlangte ich Ostern 1963 an der Berufsaufbauschule in Rheydt die Fachschulreife. Anschließend besuchte ich in Düsseldorf das Wilhelm-Heinrich-Riehl-Kolleg, wo ich Ostern 1967 die Hochschulreife zuerteilt bekam. In den folgenden zwei Jahren, von April 1967 bis 1969 absolvierte ich die Bundeswehrzeit.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1969/70 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier bestand ich im Dezember 1975 die ärztliche Prüfung.

Von Beginn 1973 bis zum Jahre 1975 arbeitete ich im Labor von Herrn Prof. Dr. med. P.C. Scriba in der II. Medizinischen Klinik, jetzt Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München an dem experimentellen Teil meiner Dissertationsarbeit.

Nach meinem Medizinstudium war ich von Beginn bis Ende 1976 als Medizinalassistent an den Universitäten München und Düsseldorf tätig. Seit Beginn 1977 habe ich an der Kinderchirurgischen Klinik der Universität München eine wissenschaftliche Verwalterstelle inne.

